

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Centro de Desenvolvimento Tecnológico – CDTec
Curso de Graduação em Biotecnologia



Trabalho de Conclusão de Curso

Azeite de Oliva como aditivo para a criopreservação de
sêmen suíno

Estela Fernandes e Silva

Pelotas, 2012

Estela Fernandes e Silva

Azeite de oliva como aditivo para a criopreservação de sêmen suíno

Trabalho acadêmico apresentado ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador do Estágio: Prof^a. Dr^a Carine Dahl Corcini

Orientador Acadêmico: Prof. Fábio Pereira Leivas Leite, PhD.

Pelotas, 2012

Dados de catalogação na fonte:

Maria Beatriz Vaghetti Vieira – CRB 10/1032

Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

S586a **Silva, Estela Fernandes e**

Azeite de oliva como aditivo para a criopreservação de sêmen suíno / Estela Fernandes e Silva. – 81f. color. – Monografia (Conclusão de curso) Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico, 2012. – Orientador Fábio Pereira Leivas Leite; co-orientador Carine Dahl Corcini.

BANCA EXAMINADORA

MsC. Elisa Caroline da Silva dos Santos

Prof. Fábio Pereira Leivas Leite, PhD. Universidade Federal de Pelotas

MsC. Jorgea Pradieé

Prof. Dr^a. Luciana Bicca Dode, Universidade Federal de Pelotas

*“Dedico este trabalho aos meus pais e a
minha irmã, a eles toda minha gratidão”*

Agradecimentos

A Deus por me dar força e fé, por ter tornado fardos mais leves para que eu chegasse até aqui;

A meus pais Volnei dos Anjos e Silva e Luisa Andreia Fernandes e Silva que incansavelmente me incentivaram, aguentaram minhas crises, me deram todo o amor necessário, não tenho palavras para agradecer: MUITO OBRIGADA, AMO VOCÊS;

A minha irmã Paula Fernandes e Silva por todo o apoio, por ser minha melhor amiga, pelo bom humor, por ser fundamental na execução desta pesquisa, sendo minha crítica hehe, MUITO OBRIGADA, TE AMO;

Aos meus avós: Inácio, Maria e Jozephina pelo carinho, conselhos, sabedoria e orações;

A minha orientadora de estágio Dr^a Carine Dahl Corcini. Acho que chamá-la de orientadora é pouco, ela foi minha salvadora, incentivadora, alguém que acreditou em mim, mesmo quando eu mesma não acreditava, que “embarcou” na ideia deste TCC, sem medir esforços;

Ao meu orientador acadêmico Fábio Leivas Leite pela confiança a mim investida e contribuição para o aperfeiçoamento do trabalho;

A MsC. Fabiana Lemos Goulart Dutra pela concessão das amostras de azeite e pelo auxílio nas questões técnicas

Ao prof. Dr. Antonio Sergio pelos ensinamentos e auxílio na execução das análises bioquímicas.

As “amigas-irmãs” Tainã e Karine sem elas eu seria muito triste, com elas até as aulas mais chatas, os momentos mais nervosos ficavam divertidos, obrigada por me ajudarem nessa caminhada; Em especial a Tainã que acompanhou minha caminhada desde o início para elaboração deste TCC e foi fundamental para que eu chegasse até aqui, obrigada de verdade por toda a paciência e amizade.

A todos os membros do Núcleo de Pesquisa, Extensão e Ensino em Reprodução Animal ReproPEL desde a coordenação até os colegas de estágio pela

amizade, pelos ensinamentos. Em especial ao professor Thomaz Lucia Junior, meu orientador de iniciação científica. Ao pessoal da pós-graduação que tornaram possível meu crescimento científico durante o período de estágio, em especial: ao Gustavo, Jorgea e Fabiana. Um agradecimento especial também às colegas de estágio: Janaína Fadrique da Silva, Geórgia Tavares, Vitória Gasperin Guazelli Costa, Tassi Vanzela e Luzia Hallal Duval que auxiliaram mais diretamente na execução desta pesquisa;

A minha orientadora de monitoria em Bioquímica, Francieli Moro Stefanello pelo apoio, incentivo e valiosa sabedoria transferida;

Aos funcionários da faculdade de Veterinária pela imensa ajuda e companheirismo, principalmente nos trabalhos durante o final de semana.

A todos que direta e indiretamente me auxiliaram para concluir esta etapa.

Resumo

SILVA, Estela Fernandes. **Azeite de Oliva como aditivo para a criopreservação de sêmen suíno**. 2012. 81f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

A criopreservação de sêmen é importante auxiliar em programas de melhoramento genético. Contudo, o congelamento e descongelamento promovem o estresse oxidativo, fenômeno relevante em suínos que possuem gametas sensivelmente afetados pelas espécies reativas de oxigênio (ERO). Logo, nos últimos anos a pesquisa com antioxidantes foi intensa, sendo crescente o estudo de antioxidantes naturais. O azeite de oliva contém uma mistura de antioxidantes naturais que atuam na neutralização de ERO, podendo ser um aditivo na criopreservação de sêmen. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do azeite de oliva na criopreservação de sêmen suíno. Utilizou-se 18 machos para a coleta de sêmen, totalizando 21 ejaculados. Após a coleta ocorria diluição (1:1) (v/v) em diluente *Beltsville Thawing Solution* (BTS) e avaliação de motilidade, sendo que as doses com motilidade igual ou superior a 70% eram avaliadas quanto à integridade de membrana, acrossoma e funcionalidade de mitocôndria e posteriormente congeladas. Para o congelamento, o sêmen era diluído nos tratamentos: controle (Con) (lactose-gema), 0,25% (T1); 0,50% (T2); 0,75% (T3) e 1,0% (T4) de azeite de oliva da variedade "Koroneiki". Em seguida, realizava-se o envase em palhetas de 0,25 mL com a concentração de $5 \cdot 10^7$ espermatozoides/mL, as quais eram congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido. O descongelamento ocorria em banho maria a 37°C, por 30 segundos e avaliava-se: a integridade de DNA, a produção de ERO, a capacidade antioxidante total e a penetração *in vitro*, além das mesmas avaliações realizadas pré-congelamento. Utilizando-se o software STATISTIX 9.0 (2008) as variáveis foram submetidas ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk que indicou ausência de normalidade. Assim, as médias foram comparadas pelo teste Kruskal-Wallis. Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os tratamentos contendo azeite e o controle para todas as variáveis analisadas. Finalmente, o azeite de oliva não incrementou os parâmetros de qualidade seminal pós-descongelamento, além de não diminuir a produção de ERO e não aumentar a capacidade antioxidante total.

Palavras-chave: Estresse oxidativo. Antioxidante. Descongelamento.

Abstract

SILVA, Estela Fernandes. **Azeite de oliva como aditivo para a criopreservação de sêmen suíno**. 2012. 81f. Trabalho de Conclusão de Curso — Curso de Bacharelado em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas.

Cryopreservation of semen is important to assist in breeding programs. However, the freezing and thawing promote oxidative stress, relevant phenomenon in pigs that possess gametes substantially affected by reactive oxygen species (ROS). Therefore, in recent years research on antioxidants has been intense, with growing study of natural antioxidants. Olive oil contains a blend of natural antioxidants that act in the neutralization of ROS, which may be an additive in semen cryopreservation. The aim of this study was to evaluate the effect of olive oil on cryopreservation of boar semen. Thus, was used 18 males for semen collection, totaling 21 ejaculates. After collection occurred dilution (1:1) (v / v) in diluent Beltsville Thawing Solution (BTS) and evaluating motility, and doses motility equal or over than 70% were evaluated for membrane integrity, and acrosome functionality of the mitochondria and subsequently frozen. For freezing, semen was diluted in treatments: control (Con) (lactose-yolk), 0.25% (T1), 0.50% (T2), 0.75% (T3) and 1.0% (T4) of the olive variety "Koroneiki". Then the filling was realized in 0.25 ml straws with the concentration of $5 \cdot 10^7$ sperm / mL, which were frozen and stored in liquid nitrogen. Thawing occurred in a water bath at 37 ° C for 30 seconds and evaluated: the integrity of DNA, the ROS generation, the total antioxidant capacity and in vitro penetration, beyond of the same evaluations pre-freezing. Using the software STATISTIX 9.0 (2008) variables were tested with the Shapiro-Wilk normality indicated that lack of normality. Thus, the means were compared by the Kruskal-Wallis test. There was no statistical difference ($p > 0.05$) among treatments containing oil and control for all variables. Finally, olive oil did not increase the parameters of post-thaw sperm quality, and not decrease ROS production and not increase the total antioxidant capacity.

Key-words: Oxidative stress. Antioxidant. Thaw

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Compostos antioxidantes presentes no azeite de oliva variedade Koroneiki.....64

Tabela 2 - Sêmen fresco: Média e Desvio padrão para motilidade (MOT), integridade de membrana plasmática (IMP), funcionalidade de mitocôndria (FM) e integridade de acrossoma (IAC).....69

Tabela 3 - Sêmen descongelado: Média e Desvio Padrão para motilidade (MOT), integridade de membrana plasmática (IMP), funcionalidade de mitocôndria (FM) e integridade de DNA (IDNA).....71

Tabela 4 - Sêmen Descongelado: Média e Desvio padrão para integridade de acrossoma (IAC), número de espermatozoides (NE) e taxa de penetração (TP)..... 72

Tabela 5 - Sêmen Descongelado: Média e Desvio Padrão para produção de Espécies reativas de oxigênio (ERO) e Capacidade antioxidante total (CAT), expressas pela área por unidade de fluorescência.....74

SUMÁRIO

Conteúdo

| | |
|---|----|
| Resumo | 8 |
| Abstract | 9 |
| Lista de Tabelas | 10 |
| 1. Introdução Geral..... | 14 |
| 2. Objetivos | 15 |
| 2.1. Objetivos gerais | 15 |
| 2.2. Objetivos específicos | 15 |
| 3. Artigo I - Revisão Bibliográfica | 16 |
| RESUMO..... | 16 |
| ABSTRACT | 16 |
| 3.1 Introdução | 17 |
| 3.1.1. Auxílio na determinação da sanidade seminal | 17 |
| 3.1.2. Auxílio em programas de melhoramento genético | 18 |
| 3.1.3. Conservação de germoplasma..... | 18 |
| 3.2. Criopreservação de sêmen suíno: Fatores internos e externos | 19 |
| 3.3. Criopreservação de sêmen suíno: Panorama atual | 21 |
| 3.4. Espécies reativas de oxigênio: Papéis fisiológicos e o estresse oxidativo | 23 |
| 3.5. Estresse oxidativo e a célula espermática suína: Características inerentes à espécie e à tecnologia de criopreservação | 26 |
| 3.6. Pesquisa com antioxidantes na criopreservação de sêmen suíno | 27 |

| | |
|---|----|
| 3.6.1 Suplementação da dieta com antioxidantes | 28 |
| 3.6.2. Suplementação de diluentes seminais com antioxidantes | 29 |
| 3.6.2.1 Selênio | 29 |
| 3.6.2.2 Superóxido dismutase (SOD) | 29 |
| 3.6.2.3. Catalase | 30 |
| 3.6.2.4. Glutathione | 30 |
| 3.6.2.5. Vitamina E (alfa-tocoferol) | 31 |
| 3.6.2.6. Cisteína | 32 |
| 3.6.2.7. Antioxidantes Naturais..... | 33 |
| Gynostemma pentaphyllum..... | 34 |
| Rodhiola sacra | 35 |
| Erva-doce..... | 36 |
| 3.7. Perspectivas..... | 37 |
| 3.8. Conclusão | 38 |
| 3.9. Referências | 39 |
| 4. Artigo 2 - Azeite de Oliva como aditivo para a criopreservação de sêmen suíno .. | 54 |
| RESUMO..... | 54 |
| Abstract | 55 |
| 4.1. Introdução | 56 |
| 4.2. Materiais e Métodos | 59 |
| 4.2.1. Animais e coleta de sêmen | 59 |
| 4.2.2. Análises de qualidade espermática pré-congelamento..... | 60 |

| | |
|---|----|
| 4.2.2.1. Motilidade..... | 60 |
| 4.2.2.2. Integridade de membrana plasmática | 60 |
| 4.2.2.3. Integridade de acrossoma..... | 60 |
| 4.2.2.4. Funcionalidade de Mitocôndria | 61 |
| 4.2.3. Processamento e criopreservação do sêmen | 62 |
| 4.2.4. Descongelamento | 64 |
| 4.2.5. Análises de qualidade espermática pós-descongelamento..... | 64 |
| 4.2.5.1. Integridade de DNA..... | 65 |
| 4.2.5.1. Produção de espécies reativas de oxigênio..... | 65 |
| 4.5.2.2. Capacidade Antioxidante Total | 66 |
| 4.5.2.3 Teste de penetração espermática in vitro | 67 |
| 4.2.5. Análises Estatísticas | 68 |
| 4.3. Resultados e Discussão..... | 69 |
| 4.4. Conclusão | 75 |
| 4.5. Referências | 75 |

1. Introdução Geral

A tecnologia de criopreservação de sêmen suíno está disponível desde 1975 (GROßFELD et al., 2008). Apesar disso, as inseminações artificiais conduzidas com o sêmen descongelado apresentam baixos níveis de concepção e leitegadas reduzidas em relação às inseminações realizadas com sêmen fresco ou refrigerado (JOHNSON et al., 2000).

Esse panorama faz com que a criopreservação não tenha aplicabilidade comercial (ERIKSSON et al., 2002; WONGTAWAN et al., 2006). Contudo, a criopreservação de sêmen é muito útil em programas de melhoramento genético, como auxiliar na minimização da transmissão de doenças e no intercâmbio internacional de material genético. Assim, a busca por mecanismos que aperfeiçoem essa tecnologia mantem-se constante (BAILEY et al., 2008).

Sabe-se que existem causas fisiológicas para a grande sensibilidade do sêmen suíno aos processos de congelamento e descongelamento, tais como: o alto teor de ácidos graxos poliinsaturados nas membranas plasmáticas e também uma baixa defesa antioxidante citoplasmática e no plasma seminal (JOHNSON et al., 1969; BREZEZINSKA-SLEBODZINSKA et al., 1995).

Nesse contexto, um importante mecanismo para o aperfeiçoamento dessa tecnologia seria a adição de antioxidantes tanto à dieta de machos suínos, quanto aos diluentes de congelamento, resfriamento e descongelamento (BATHGATE,

2011). Nesse âmbito, a pesquisa com antioxidantes na criopreservação de sêmen suíno tem sido amplamente estudada nos últimos anos (MALO et al., 2010).

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

Avaliar os efeitos da adição do azeite de oliva na criopreservação de sêmen suíno.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar o efeito de diferentes concentrações de azeite de oliva sobre parâmetros de qualidade seminal pós-descongelamento.

Determinar a ação antioxidante de diferentes concentrações de azeite de oliva em sêmen suíno através da análise de produção de espécies reativas de oxigênio e capacidade antioxidante total.

3. Artigo I - Revisão Bibliográfica

Criopreservação de sêmen suíno e a pesquisa com antioxidantes

RESUMO – A criopreservação de sêmen pode auxiliar o melhoramento genético, a determinação de sanidade seminal, bem como a conservação de germoplasma. Contudo, esta tecnologia não é aplicada comercialmente para a espécie suína devido à baixa sobrevivência e viabilidade espermática pós-descongelamento. Essa sensibilidade deve-se, em parte, ao estresse oxidativo, caracterizado pelo aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) durante congelamento e descongelamento, combinado a características fisiológicas da espécie, como a composição lipídica da membrana plasmática. Assim, a adição de antioxidantes – moléculas capazes de neutralizar ERO – à dieta de machos e aos diluentes de sêmen trata-se de uma alternativa vastamente pesquisada nos últimos anos. Dentre os antioxidantes pesquisados, nota-se um crescimento da pesquisa com antioxidantes naturais, oriundos de espécies vegetais. Desse modo, a presente revisão tem por objetivo abordar os aspectos relacionados à pesquisa com antioxidantes para a criopreservação de sêmen suíno.

Palavras-chave: Antioxidante. Motilidade. Membrana plasmática.

ABSTRACT – Cryopreservation of semen can assist breeding programs, in determining seminal sanity health, as well as for conservation of germplasm. However, this technology is not applied commercially for swine due to low survival and viability of sperm after thawing. This sensitivity is due in part to oxidative stress, characterized by increased formation of reactive oxygen species (ROS) during freezing and thawing, combined with physiological characteristics of the specie, such as the lipid composition of the plasma membrane. Thus, the addition of antioxidants - molecules capable of neutralizing ROS – in the diet of male or in semen diluents are alternatives widely investigated in recent years. Among the antioxidants studied,

there is a growth of research with natural antioxidants from plant species. Thus, this review aims to address the issues related to research with antioxidants to the cryopreservation of boar semen.

Key-words: Antioxidant. Motility. Plasma membrane.

3.1 Introdução

A criopreservação trata-se de uma tecnologia em que células, tecidos ou embriões são preservados a temperaturas abaixo do ponto de congelamento da água para reduzir o metabolismo celular, tendo como objetivo preservar a composição e viabilidade celular por tempo indefinido (PEGG, 2002). A preservação espermática por tempo indeterminado traria importantes vantagens à suinocultura, como por exemplo:

3.1.1. Auxílio na determinação da sanidade seminal

Os agentes causadores de duas importantes doenças para a suinocultura – a síndrome multissistêmica pós desmame e a síndrome reprodutiva e respiratória – podem ser transmitidos pelo sêmen de machos suínos aparentemente saudáveis (CHRISTOPHER-HENNINGS et al., 1995; GUÉRIN et al., 2005; MCINTOSH et al., 2006). Nesse âmbito, a criopreservação auxiliaria na manutenção da viabilidade seminal para que o sêmen pudesse ser armazenado pelo tempo necessário e cuidadosamente avaliado quanto a presença de patógenos transmissíveis, antes da inseminação artificial (IA) (GARCIA et al., 2010). Assim, o controle de patógenos

auxiliado pela criopreservação do sêmen seria importante não somente em nível de granja, mas também para a comercialização de sêmen em mercados internacionais, garantindo a biossegurança global (BAILEY et al., 2008).

3.1.2. Auxílio em programas de melhoramento genético

A IA com sêmen de machos zootecnicamente superiores pode incrementar características de interesse de um plantel através do melhoramento genético. Nesse contexto, a criopreservação pode auxiliar para diminuir o transporte de machos para um programa de melhoramento genético, além de garantir o intercâmbio internacional de material genético (KAEOKET et al., 2012).

3.1.3. Conservação de germoplasma

Em convenção sobre “Diversidade Biológica”, a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) afirmou que os recursos genéticos para a alimentação e a agricultura, que inclui o germoplasma dos animais domésticos como os suínos, são a base biológica da segurança alimentar mundial. Assim, a disponibilidade de germoplasma funcional criopreservado seria necessária à elaboração de um banco genético eficaz, garantindo a segurança alimentar (FAO, 1993).

3.2. Criopreservação de sêmen suíno: Fatores internos e externos

Os fatores que influenciam na tecnologia de congelamento de sêmen podem ser classificados em dois grupos. O primeiro grupo seria o de fatores internos ou fixos, aqueles inerentes aos espermatozoides e referentes às diferenças entre os machos e ejaculados. O segundo grupo seria de fatores externos, relativos à composição de diluentes, tipo e concentração de agentes crioprotetores, taxas de diluição e refrigeração, tempo de equilíbrio e método de congelamento e descongelamento do sêmen.

Os fatores externos, diferentemente dos internos, são passíveis de modificação para o melhoramento dos protocolos de congelamento. Com isso, uma melhoria importante seria na composição dos diluentes de congelamento (JOHNSON et al., 2000; BARBAS e MASCARENHAS, 2009).

Os diluentes de congelamento devem assegurar uma fonte de energia, pH e pressão osmótica adequados, além de reduzir o choque térmico e inibir o crescimento bacteriano (KARABINUS et al., 1997). Os componentes básicos de um diluente são açúcares, proteínas, lipoproteínas, tampões, aditivos e agentes crioprotetores.

O diluente Lactose-gema (LEY), composto do dissacarídeo lactose e de gema de ovo, é o padrão para o congelamento de sêmen suíno e possui as características

de um alto teor de lipoproteínas e baixas propriedades antioxidantes (YAMAMOTO et al., 1994).

A gema de ovo é amplamente utilizada para o congelamento de sêmen de espécies domésticas. Contudo, o nível de proteção da gema de ovo não tem a mesma magnitude na espécie suína (JOHNSON et al., 2000). Para contornar esse problema, adiciona-se ao diluente um detergente sintético baseado em sódio e trietanolamina lauril sulfato, chamado Orvus Es Paste (OEP), comercialmente conhecido como “Equex”, que possivelmente fornece proteção ao modificar os componentes da gema de ovo do diluente (PURSEL et al., 1978).

Os agentes crioprotetores (AC) são substâncias capazes de diminuir ou inibir os danos gerados pela criopreservação, como a formação de cristais de gelo. Os AC são divididos entre externos ou não-penetrantes – sendo exemplos desses a lactose a gema de ovo (JASKO, 1994) – e internos ou penetrantes, como o glicerol (SANTOS et al., 2008).

Dentre os crioprotetores internos frequentemente utilizados para a espécie suína está o glicerol, geralmente na concentração de 3% (BIANCHI et al., 2008), pois concentrações superiores podem diminuir a motilidade e a integridade acrossomal devido a uma toxicidade química ou a um choque osmótico pela diluição rápida do glicerol em ocasião do descongelamento (JOHNSON et al., 2000).

3.3. Criopreservação de sêmen suíno: Panorama atual

Apesar do sêmen suíno congelado estar disponível comercialmente desde 1975 (JOHNSON, 1985), mais de 99% das 19 milhões de inseminações conduzidas em todo o mundo são realizadas com sêmen diluído no mesmo dia da coleta, ou armazenado a 15-20 °C cerca de 1 a 5 dias. Assim, menos de 1% de todas as inseminações são feitas utilizando o sêmen suíno descongelado (JOHNSON et al., 2000).

Os danos espermáticos gerados pela criopreservação de sêmen suíno resultam em queda de 20-30% nas taxas de concepção e uma diminuição no número de leitões nascidos vivos na leitegada após inseminação com sêmen descongelado, em comparação com as taxas obtidas com sêmen fresco diluído (ERIKSSON et al., 2002; WONGTAWAN et al., 2006). As baixas taxas de fertilidade do sêmen descongelado ocorrem pois cerca de 40-50% dos espermatozoides não sobrevivem à criopreservação (ALMLID e JOHNSON 1988; WATSON, 2000). Além disso, os gametas remanescentes do processo apresentam baixa motilidade individual e integridade de membrana plasmática, além de tempo de sobrevivência curto no trato reprodutivo feminino em comparação com sêmen fresco diluído (4 h vs 24 h) (WABERSKI et al., 1994; SARAVIA et al., 2005). As razões para essa queda da fertilidade são várias, como a sensibilidade ao choque térmico (FLESCHE e GADELLA, 2000), o estresse osmótico (AITKEN e KRAUSZ, 2001) e a formação de

cristais de gelo intracelulares durante o congelamento e descongelamento (MOLINIA et al., 1994).

Durante os últimos anos, surgiram inúmeros aperfeiçoamentos para a criopreservação de sêmen suíno, incluindo métodos que modificam as taxas de congelamento-descongelamento (ERIKSSON et al., 2000; CÓRDOVA-IZQUIERDO et al., 2006) e mudanças na composição dos diluentes de sêmen (PENÃ et al., 2003). Dentre as mudanças na composição de diluentes, a adição de antioxidantes é uma opção crescente pelo fato dos radicais livres ocasionarem queda de motilidade, viabilidade e integridade de DNA espermático (MALO et al., 2010).

Nesse âmbito, mesmo diante das vantagens da criopreservação e das décadas de pesquisa, o congelamento, para a espécie suína, não é capaz de gerar níveis aceitáveis de fertilidade espermática pós-descongelamento para utilização em inseminação artificial (IA) em sistemas comerciais de produção. Logo, estando a criopreservação relacionada a um aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) provocando um estresse oxidativo (CHATTERJEE e GAGNON, 2001) a adição de antioxidantes à dieta e aos diluentes de resfriamento, congelamento e descongelamento parece ser uma alternativa interessante. Nesse contexto, a revisão tratará a seguir de conceitos e papéis de EROs e antioxidantes relacionados ao congelamento de sêmen suíno.

3.4. Espécies reativas de oxigênio: Papéis fisiológicos e o estresse oxidativo

A produção de energia em forma de ATP na mitocôndria necessita do oxigênio (O_2) como aceptor de elétrons, sendo este reduzido e a água formada. Em uma célula saudável, 1-2% do O_2 é convertido em um intermediário reativo de oxigênio, espécies reativas de oxigênio (ERO), em vez de converter-se em água.

Dentre essas ERO tem-se o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil ($\bullet OH$), óxido nítrico (NO) e peroxinitrito ($ONOO^-$). Tanto o O_2^- quanto o H_2O_2 são formados como subprodutos da conversão de O_2 , mas o radical hidroxil é formado a partir da interação entre o H_2O_2 e Ferro (RHOADES e PFLANZER, 1996) e o peroxinitrito surge da interação entre NO e O_2 (MORAN et al., 2008). O óxido nítrico é biossintetizado através de um número de isoformas da enzima óxido nítrico sintase, (HERRERO e GAGNON, 2001). As ERO são instáveis e altamente reativas, necessitando da aquisição de elétrons para se tornarem estáveis. Assim, essas moléculas obtêm elétrons a partir de ácidos nucleicos, lipídios, proteínas, carboidratos ou qualquer outra molécula próxima, podendo ser consideradas agentes oxidantes (AQARWAL et al., 2005). A geração de ERO é um pré-requisito essencial para a função normal das células, no entanto, a formação excessiva pode conduzir a dano celular e patologia (HALLIWELL e ARUOMA, 1991).

Dentre os benefícios ou papéis fisiológicos das ERO para os espermatozoides, tem-se a necessidade dessas para a hiperativação, capacitação,

reação acrossômica e eventos de ligação à zona pelúcida (KODAMA et al., 1996; De LAMIRANDE et al., 1997; HERRERO et al., 2003). As ERO contribuem também para a formação normal dos espermatozoides no que diz respeito a condensação da cromatina, a remodelação da membrana e a ativação de vias de sinalização intracelular (KODAMA et al., 1996; PONS-REJRAJI et al., 2009).

Em condições normais, antioxidantes convertem as ERO em subprodutos seguros para evitar danos. Todavia, quando há desequilíbrio entre a produção de ERO e a detoxificação, através de antioxidantes, o excesso de ERO gera o “Estresse Oxidativo” que provoca efeitos prejudiciais ao gameta. Dentre os efeitos prejudiciais das ERO sobre os espermatozoides, tem-se danos à membrana plasmática (FORD, 2004), danos à integridade do DNA (BAUMBER et al., 2003), bloqueio do metabolismo oxidativo (MAKKER et al., 2009), redução da fusão com o oócito (GRIVEAU e Le LANNOU, 1997) e redução da motilidade e viabilidade dos espermatozoides e a peroxidação lipídica das membranas (BUCAK et al., 2007).

Os danos gerados pelas EROs durante o estresse oxidativo ocorrem em função de reações com fosfolípidos, pela oxidação de grupos sulfidril de enzimas e outras proteínas de indução. O ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são capazes de se difundir em torno da célula, causando danos extensos. Por outro lado, mesmo o $\bullet OH$ sendo o mais reativo, ameaça áreas mais restritas, imediatamente ao redor do local de produção (RHOADES e PFLANZER, 1996).

As defesas naturais ou os agentes antioxidantes visam manter o equilíbrio entre a produção e a detoxificação de ERO. Essas defesas são baixas nos gametas, principalmente de mamíferos, os quais descartam a maior parte do citoplasma durante a fase terminal de diferenciação, lhes faltando um componente citoplasmático que significativamente pode neutralizar os efeitos nocivos das ERO (HU et al., 2009). Assim, outra alternativa de defesa antioxidante seria o plasma seminal, o qual é dotado de uma bateria de enzimas antioxidantes compreendendo a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione-peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) e glutathione S-transferase (GST) (ALVAREZ et al., 1987; BECONI et al., 1993; MARTI et al., 2007; STRZEZEK et al., 2009). A enzima superóxido dismutase (SOD) recolhe o ânion superóxido e converte-o em H_2O_2 e oxigênio. O H_2O_2 a partir desta reação é, por sua vez eliminado pela catalase e peroxidase, resultando em água e oxigênio (BATHGATE et al., 2011). Além disso, o plasma seminal está equipado com diversos antioxidantes não enzimáticos, tais como a glutathione (GSH), L-ergotioneína (ERT), ascorbato, urato, alfa-tocoferol, piruvato, taurina e hipotaurina (STOREY, 1997; STRZEZEK et al., 1999). A glutathione está presente em concentrações relativamente elevadas em muitas células. É o principal mecanismo pelo qual as células se protegem contra o $\bullet OH$. A glutathione doa um elétron e, portanto, estabiliza e, posteriormente, neutraliza EROs (BATHGATE et al., 2011). A vitamina E (alfa tocoferol) pode quebrar as ligações

covalentes que se formaram entre as ERO e as cadeias laterais de ácidos graxos dos lipídios da membrana (BREZEZINSKA-SLEBODZINSKA et al., 1995). Mesmo sendo o plasma seminal um fluido dotado de defesas antioxidantes, os suínos possuem baixos níveis de enzimas antioxidantes neste fluido (STRZEZEK, 1999). Além disso, o plasma seminal é descartado, após centrifugação, para o processo de criopreservação. O descarte do plasma ocorre, pois *in vivo* este não acompanha o gameta durante a ascensão no trato reprodutivo da fêmea, sugerindo que sua remoção é necessária para o processo de capacitação espermática (MAXWELL e JOHNSON, 1999).

3.5. Estresse oxidativo e a célula espermática suína: Características inerentes à espécie e à tecnologia de criopreservação

O descarte do plasma seminal através da centrifugação e a redução da temperatura, os quais fazem parte dos protocolos de criopreservação, resultam em redução da qualidade e quantidade de antioxidantes e de um aumento na quantidade de ERO contido no sêmen (BILODEAU et al., 2001). Esse aumento na produção de ERO provavelmente ocorre devido a danos às mitocôndrias, que são a principal fonte de produção de ERO (PEÑA et al., 2009). Assim, as ERO gerados pela mitocôndria provocam a liberação de proteínas pré-apoptóticas, como a

citocromo c, que desencadeiam a capacitação e morte celular (MISHRA e SHANA, 2005).

O sêmen suíno torna-se facilmente danificado pelo excesso de EROs durante a criopreservação. Este fato deve-se a um elevado teor de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) nos fosfolípidos da membrana, como o docosapentaenóico (DPA) e o docosahexaenóico (DHA) que diminuem devido à peroxidação lipídica (CEROLINI et al., 2001), bem como a um baixo nível na proporção colesterol: fosfolípidos de membrana (JOHNSON et al., 1969; PARKS et al., 1992). Ainda, o plasma seminal da espécie possui uma atividade antioxidante baixa que pode favorecer os danos oxidativos ainda *in vivo* (BREZEZINSKA-SLEBODZINSKA et al., 1995).

3.6. Pesquisa com antioxidantes na criopreservação de sêmen suíno

Sabendo-se dos efeitos prejudiciais do estresse oxidativo e da susceptibilidade dos gametas da espécie suína a esse fenômeno, o estabelecimento de um ambiente livre ou com baixos níveis de EROs é o foco da pesquisa atual (MORAN et al., 2008; JEONG et al., 2009; COYAN et al., 2010; du PLESSIS et al., 2010). Assim, nos últimos anos, a pesquisa com uma grande variabilidade de antioxidantes para aperfeiçoar a criopreservação de sêmen suíno e aumentar a sobrevivência espermática pós-descongelamento foi extensa (MALO et al., 2010).

Nesse âmbito, pode-se dividir a pesquisa com antioxidantes para a criopreservação de sêmen em dois temas (BATHGATE, 2011) :

3.6.1 Suplementação da dieta com antioxidantes

A primeira é a suplementação da dieta – a adição de antioxidantes na alimentação a fim de que esses sejam direcionados aos órgãos sexuais e, posteriormente, aumentem os níveis de antioxidantes no plasma seminal e espermatozoides, para proteger os gametas durante o processo de criopreservação (BATHGATE, 2011) .

A suplementação alimentar com antioxidantes, tais como ácido ascórbico, tocoferol, o selênio ou certas enzimas, pode ser associada a uma melhora nos mecanismos de defesa antioxidantes em espermatozoides, resultando na prevenção de danos por radicais livres nos testículos e epidídimo, bem como no ejaculado e no sêmen processado durante, por exemplo, o processo de congelamento (AUDET et al., 2004; ESKENAZI et al., 2005; SÖNMEZ et al., 2005; AKMAL et al., 2006; EID et al., 2006; MANSOUR et al., 2006). Contudo, a presente revisão abordará mais detalhadamente o papel dos antioxidantes adicionados diretamente aos diluentes utilizados no congelamento e descongelamento de sêmen suíno.

3.6.2. Suplementação de diluentes seminais com antioxidantes

O segundo método de suplementação com antioxidantes é a adição direta aos diluentes utilizados, principalmente, no processo de congelamento (BATHGATE, 2011). Durante a última década, vários estudos se concentraram na suplementação com uma variedade desses antioxidantes, sendo alguns desses mencionados abaixo:

3.6.2.1 Selênio

O selênio (Se) é um micronutriente essencial para seres humanos e animais, pois está presente no sítio ativo de inúmeras enzimas antioxidantes atuando como co-fator (GROMER et al., 2005). Contudo, a atuação do Se como auxiliar na proteção antioxidante parece mais promissora quando adicionado à dieta dos machos suínos, pois segundo Audet et al. (2004) a adição ao diluente é capaz de reduzir a motilidade espermática.

3.6.2.2 Superóxido dismutase (SOD)

Essa enzima antioxidante é uma metaloproteína que se apresenta com diferentes metais em seu sítio ativo e atua na neutralização do ânion superóxido (WUERGES et al., 2004). Estudos conduzidos com a espécie bovina revelaram o papel positivo da SOD como antioxidante para o congelamento de sêmen bovino. Na espécie suína, segundo revisão de literatura de Großfeld et al. (2008), a utilização de

SOD, separadamente ou juntamente com a catalase, é capaz de aumentar a sobrevivência espermática pós- descongelamento na espécie suína.

3.6.2.3. Catalase

A catalase é um tetrâmero com quatro grupamentos heme, encontrado em todos os organismos aeróbicos e realiza proteção antioxidante por neutralizar o peróxido de hidrogênio (SCANDALIOS, 2005; RATNAM et al., 2006). Essa enzima mostrou-se benéfica para o congelamento e resfriamento de sêmen bovino após a sexagem (WHITE et al., 1993). Para os suínos, a catalase, separadamente ou em combinação com a superóxido dismutase, mostrou-se benéfica ao congelamento de sêmen da espécie (PURSEL et al., 1978). Além disso, a catalase combinada ao piruvato e ao mercaptoetanol aumentou significativamente a motilidade espermática do sêmen suíno descongelado (THURSTON et al., 2002).

3.6.2.4. Glutathione

A Glutathione (L-g-glutamyl-L-cysteinylglycine; GSH) é um tripeptídeo amplamente distribuído em células vivas e desempenha um papel importante na defesa antioxidante intracelular (IRVINE, 1996).

O processo de congelação está associado com uma redução significativa no conteúdo de glutathione em suínos (GADEA et al., 2004), bovinos (BILODEAU et al., 2000) e outras espécies. Assim, a adição de glutathione ao diluente de

descongelamento de sêmen suíno resultou em uma menor proporção de espermatozoides capacitados precocemente pela redução da formação de ERO (WOELDERS et al., 1996).

Em um experimento de Funahashi e Sano (2005) com sêmen suíno resfriado a 10°C a glutathiona foi capaz de preservar uma alta viabilidade celular mesmo após 7 e 14 dias de armazenamento.

3.6.2.5. Vitamina E (alfa-tocoferol)

O termo vitamina E compreende um grupo de substâncias com poder antioxidante. Existem oito compostos naturais de vitamina E: alfa-, beta-, gama-, e delta tocoferol e tocotrienol. Dentre esses compostos, o alfa tocoferol destaca-se por ser o mais importante na proteção dos componentes celulares contra o dano oxidativo (KIYOSE et al., 1997). O poder antioxidante da vitamina E se deve ao fato de atuar como co-fator da enzima antioxidante glutathiona (BATHGATE, 2011).

A adição de alfa-tocoferol ao diluente de congelamento exerceu efeito protetor sobre a membrana plasmática de espermatozoides suínos (BREININGER et al., 2005), além de melhorar a motilidade e integridade de acrossoma pós descongelamento (PEÑA et al., 2003; SATORRE et al., 2007), diminuindo a taxa de espermatozoides capacitados precocemente (SATORRE et al., 2007) e a apoptose (JEONG et al., 2009). Assim, para obter os melhores resultados de fertilização, o

alfa-tocoferol pode ser utilizado como um suplemento durante o congelamento de sêmen suíno.

O hidroxitolueno butilado (BHT), um análogo sintético da vitamina E, tem sido utilizado extensivamente e com algum sucesso para melhorar a qualidade do sêmen suíno pós-descongelamento (ROCA et al., 2004). Em suíno, hidroxitolueno butilado (BHT), verificou-se ser eficaz na redução da lesão de choque a frio (BAMBA et al., 1992) e na sobrevivência dos espermatozóides após o descongelamento (ROCA et al., 2004).

3.6.2.6. Cisteína

A cisteína é um aminoácido que contém enxofre, sendo precursora da biossíntese da glutatona intracelular (BILODEAU et al., 2001). Pelo seu poder como antioxidante, a cisteína tem sido utilizada como antioxidante na criopreservação de sêmen suíno (de LAMIRANDE e GAGNON, 1992; TAYLOR et al., 2009).

Funahashi e Sano (2005) demonstraram que um suplemento de L-cisteína (5 mmol/L) pode aumentar a viabilidade e motilidade progressiva de sêmen suíno fresco e diluído. Contudo, nenhuma pesquisa havia se aprofundado na avaliação de uma concentração ideal de cisteína durante a criopreservação de sêmen suíno. Assim, Kaeoket et al. (2010) encontrou uma porcentagem alta e com significância estatística de motilidade progressiva, viabilidade e integridade acrossomal em diluentes suplementados com 5 e 10 mmol de L-cisteína, comparados com o

controle (lactose gema). Finalmente, esses autores concluíram que 5 ou 10 mmol são concentrações ideais para serem adicionadas ao diluente padrão (lactose gema) para congelamento de sêmen suíno e aumentar a qualidade seminal pós descongelamento.

3.6.2.7. Antioxidantes Naturais

Nota-se que a pesquisa com antioxidantes é vasta (MALO et al., 2011), contudo existem poucos dados sobre os efeitos de antioxidantes naturais em espermatozoides. Desse modo, há um interesse crescente na pesquisa com esse tipo de antioxidante devido aos problemas de segurança e toxicidade de antioxidantes sintéticos como o hidroxianisol butilado (BHA) e o propil galato (PG) (MALO et al., 2011). Antioxidantes naturais são compostos multifuncionais que podem atuar como agentes redutores. Assim, serão citados abaixo alguns dos principais antioxidantes naturais testados em suínos:

Alecrim

O alecrim (*Rosmarinus officinalis*), uma erva perene da família *Lamiaceae* possui componentes que se destacam como antioxidantes, como os ácidos carnósico e rosmânico (CUVELIER et al., 1996; FRANKEL et al., 1996;

RICHEIMER et al., 1996; GIL et al., 2010; GONZÁLEZ et al., 2010; MALO et al., 2010).

Estudos recentes utilizaram o alecrim com sucesso para a criopreservação de sêmen suíno (MALO et al., 2010), ovino (GIL et al., 2010) e canino (GONZÁLEZ et al., 2010), melhorando a motilidade pós-descongelamento e parâmetros de fertilização *in vitro*.

Malo et al. (2010) avaliou o papel do extrato aquoso de *Rosmarinus officinalis* adicionada ao diluente padrão (lactose gema) na qualidade seminal pós descongelamento de sêmen suíno. Nesse estudo, a *Rosmarinus officinalis* mostrou-se promissora como adjuvante do diluente pois foi capaz de prolongar a motilidade total em 3h (obtendo motilidade de 40% 3h após o descongelamento) e ser efetiva nas taxas de penetração, clivagem e fertilização *in vitro*.

Gynostemma pentaphyllum

Gynostemma pentaphyllum (GP) é uma espécie de erva perene em forma de arbusto do gênero de *Cucurbitaceae*, sendo comestível e conhecida como erva medicinal (HU et al., 1996). Hu et al. (2009) avaliou o efeito da GP sobre a congelabilidade de sêmen suíno suplementado com diferentes concentrações de polissacarídeos dessa espécie vegetal sobre os seguintes parâmetros de qualidade

seminal: motilidade, integridade de membrana plasmática e acrossoma, atividade mitocondrial e ensaios bioquímicos para a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. Dentre as concentrações testadas (0,25; 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0mg/mL) a de 0,5mg/mL de polissacarídeos de GP gerou efeitos crioprotetores benéficos e foi proposta pelos autores como uma concentração para a suplementação de diluentes de congelamento de sêmen suíno, pois gerou níveis em torno de 50% para os parâmetros de motilidade, integridade de acrossoma e membrana e funcionalidade de mitocôndria no sêmen descongelado.

Rodhiola sacra

O extrato aquoso de *Rhodiola sacra* (ERAS) é oriundo de raízes de *Rhodiola rosea* L. (*Crassulaceae*), um gênero de erva chinesa, tem sido usado como um antioxidante (OHSUGI et al., 1999; MOOK-JUNG et al., 2002). Em alguns estudos, ERAS teve atividade neutralizadora forte contra o radical superóxido (O_2^-) (MOOK-JUNG et al., 2002) e inibiu a peroxidação lipídica (ZHANG et al., 2005). Porém, as propriedades antioxidantes do ERAS são bem estabelecidas em células somáticas, sendo escassos os dados acerca dos efeitos de ERAS sobre as propriedades antioxidantes para a criopreservação de sêmen suíno.

Zhao et al. (2009) realizou um estudo para avaliar os efeitos antioxidantes da ERAS sobre a qualidade de sêmen suíno nas concentrações de 0 (controle), 2, 4, 6,

8 e 10 mg/L em diluente à base de gema de ovo e glicose, com ou sem glicerol. A pesquisa mostrou que a concentração efetiva de ERAS no diluente variou de 4 a 8 mg/L e os benefícios da erva sobre a qualidade espermática foram acentuados na ausência de glicerol. Além disso, ocorreu uma correlação direta ($p < 0,05$) entre as concentrações de ERAS e glutathione (GSH) e uma correlação inversa ($r = - 0,982$, $p < 0,05$) entre a concentração da erva e do malondialdeído (relacionado à peroxidação lipídica das membranas). Apesar dos resultados promissores, segundo os autores ainda se torna necessário determinar o ingrediente ativo presente na ERAS que atua como antioxidante.

Erva-doce

A erva-doce (*Foeniculum vulgare*), pertencente à família *Apiaceae*, é uma erva perene nativa da região mediterrânea, agradavelmente aromática e usada na culinária, exibindo conservantes naturais para produtos alimentares. Sua composição química foi bem descrita na literatura (PAREJO et al., 2004) e, considerando as suas propriedades antioxidantes, a mesma tem a capacidade de aumentar significativamente a atividade da superóxido dismutase e da catalase (CHOI & HWANG, 2004). Desse modo, Malo et al. (2012) avaliaram os efeitos da adição de essências de erva-doce nas concentrações: baixa (0,025g/mL), média (0,05g/mL) e alta (0,1g/mL) considerando que a erva poderia melhorar a

criopreservação de sêmen por possuir antioxidantes. Assim, os resultados demonstraram que concentrações mais elevadas de erva-doce produziram uma melhora significativa da motilidade total. Ainda, houve uma tendência dose dependente de aumentar a viabilidade seminal. Apesar disso, a erva-doce não apresentou efeitos significativos sobre a integridade de acrossoma e a integridade de membrana (efetuada pelo teste hiposmótico) comparada ao controle (lactose gema). A geração de malondialdeído (relacionado à peroxidação lipídica) diminuiu significativamente nos grupos de erva-doce, produzindo resultados semelhantes para 0,05 e 0,1mg/mL. Logo, a erva doce parece um antioxidante promissor para uso na criopreservação de sêmen, contudo seria interessante compreender a atuação dessa erva na estimulação da motilidade e na diminuição da peroxidação lipídica.

3.7. Perspectivas

A adição dos antioxidantes aos diversos diluente foi capaz de gerar efeitos benéficos aos gametas pós-descongelamento. No entanto, os dados acerca da fertilidade de sêmen descongelado que foi suplementado com antioxidantes são escassos. Esse fato provavelmente deve-se ao maior tempo necessário para obtenção dos resultados em experimentos *in vivo*, sendo estes menos frequentes. Recentemente, Yamaguchi e Funahashi (2012) avaliaram a efetividade do

antioxidante beta-mercaptoetanol (BME) adicionado ao diluente de descongelamento contendo cafeína, após inseminação de fêmeas suínas. Os resultados demonstraram que o BME foi capaz de inibir a reação acrossomal espontânea. Contudo, não houve diferença estatística entre fêmeas inseminadas com sêmen com ou sem 50 μM de BME, considerando taxas de prenhez e parto (sendo as taxas de prenhez e parto com BME de 21% e sem BME de 20%). Desse modo, seria interessante uma validação dos resultados apresentados pelos demais antioxidantes mencionados nesta revisão, através da inseminação artificial a fim de avaliar a efetividade *in vivo* do uso de antioxidantes.

3.8. Conclusão

A criopreservação de sêmen suíno geraria inúmeros benefícios à suinocultura, como um aumento na produção através do melhoramento genético, uma maior biossegurança pela minimização da transmissão de patógenos, além de facilitar o intercâmbio internacional de material genético e assegurar a segurança alimentar em nível mundial pela formação de um banco de germoplasma. Contudo, a viabilidade seminal pós-descongelamento ainda é precária para que a inseminação artificial ocorra com sucesso. Esse resultado negativo deve-se a fatores fisiológicos da espécie e também ao estresse oxidativo. Contudo, esse estresse pode ser minimizado pela adição de antioxidantes a dieta e ao diluente,

sendo esta uma área vastamente pesquisada nos últimos anos. Acredita-se que o investimento na pesquisa com antioxidante associado com experimentos *in vivo* possa trazer resultados positivos para um aumento da sobrevivência espermática pós-descongelamento de sêmen suíno.

3.9. Referências

AITKEN, R.J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. **Reproduction**, v.122, p. 497–506, 2001.

AKMAL, M.; QUADRI, J.Q.; AL-WAILI, N.S.; THANGAL, S.; HAQ, A.; SALOOM, K.Y. Improvement in human semen quality after oral supplementation of vitamin C. **Journal of Medicinal Food**, v. 9, p. 440–442, 2006.

ALMLID, T.; JOHNSON, L.A. Effect of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. **Journal of Animal Science**, v. 66,p. 2899–2905, 1988.

ALVAREZ, J.G.; TOUCHSTONE, J.C.; BLASCO, L.; STOREY, B.T. Spontaneous lipid peroxidation and producing of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.8, p. 338–348, 1987.

AQARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R.K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.3, p. 1–21, 2005.

AUDET, I.; LAFOREST, J.P.; MARTINEAU, G.P.; MATTE, J.J. Effect of vitamin supplements on some aspects of performance, vitamin status, and semen quality in boars. **Journal of Animal Science**, v.82,p. 626–633, 2004.

BAILEY, J. L.; LESSARD, C.; JACQUES, J.; BRE`QUE, C.; DOBRINSKI, I.; ZENG, W.; GALANTINO-HOMER, H. L. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. **Theriogenology**, v.70, p. 1251–1259, 2008.

BARBAS, J.P.; MASCARENHAS, R.D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. **Cell Tissue Bank** , v.10,p. 49–62, 2009.

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J.; MEYERS, S.A. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 24,p. 621–628, 2003.

BATHGATE, R. Antioxidant Mechanisms and their Benefit on Post-thaw Boar Sperm Quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46 (Suppl 2),p. 23–25, 2011.

BAMBA, K.; CRAN, D.G. Effects of treatment with butylated hydroxytoluene on the susceptibility of boar spermatozoa to cold stress and dilution. **The Journal of the Society Reproduction and Fertility**, v.95, p. 69 –77, 1992.

BECONI, M.T.; FRANZIA, C.R.; MORA, N.G.; ARANCHINO, M.A. Efect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. **Theriogenology** v.40, p. 841–851, 1993.

BIANCHI, I.; CALDERAM, K.; MASCHIO, É.F.; MADEIRA, E.M.; ULGUIM, R.R.; CORCINI, C.D.; BONGALHARDO, D.C.; CORRÊA, É.K.; LUCIA JR., T.; DESCHAMPS, J.C.; CORRÊA, M.N. Evaluation of amides and centrifugation

temperature in boar semen cryopreservation. **Theriogenology**, v.69, p. 632-638, 2008.

BILODEAU, J.; BLANCHETTE, F.S.; GAGNON, C.; SIRARD, M.A. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, v.256, p. 275–86, 2001.

BILODEAU, J.F.; CHATTERJEE, S.; SIRARD, M.A.; GAGNON, C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, p. 282–288, 2000.

BREININGER, E.; BEORLEGUI, N.B.; O'FLAHERTY, C.M.; BECONI, M.T. Alphatocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. **Theriogenology**, v.63, p. 2126–2135, 2005.

BREZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E.; SLEBODZINSKI, A.B.; PIETRAS, B.; WIECZOREK, G. Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. **Biological Trace Element Research**, v.47, p. 69–74, 1995.

BUCAK, M.N.; ATESSAHIN, A.; VARISH, O.; YUCE, A.; AKCAY, A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. **Theriogenology**, v. 67, p. 1060–1067, 2007.

CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; PIZZI, F.; GLIOZZI, T.M. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. **Reproduction**, v.121, p.395–401, 2001.

CHATTERJEE, S.; GAGNON, C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v.59, p.451–458, 2001.

CHOI, E.M.; HWANG, J.K. Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of the fruit of foeniculum vulgare. **Fitoterapia**, v.75, p. 557–565, 2004.

CHRISTOPHER-HENNINGS, J.; NELSON, E.A.; HINES, R.J.; NELSON, J.K.; SWENSON, S.L.; ZIMMERMAN, J.J. et al. Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.7, p.456–464, 1995.

CÓRDOVA-IZQUIERDO, A; OLIVA, J.H.; LLEÓ, B.; GARCÍA-ARTIGA, C.; CORCUERA, B.D. et al. Effect of different thawing temperatures on the viability, *in vitro* fertilizing capacity and chromatin condensation of frozen boar semen packaged in 5 mL straws. **Animal Reproduction Science**, v.92, p. 145–154, 2006.

COYAN, K.; BASPINAR, N.; BUCAK, M. N.; AKALM, P. P.; ATAMAN, M. B.; OMÜR, D.; GÜNGÖR, S.; KÜÇÜKGÜNAY, S.; OZKALP, B.; SARIÖZKAN, S. Influence of methionine and dithioerythritol on sperm motility, lipid peroxidation and antioxidant capacities during liquid storage of ram semen. **Research in Veterinary Science**, v.89, p. 426–431, 2010.

CUVELIER, M.E.; RICHARD, H.; BERSET, C. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.73, p. 645–652, 1996.

De LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. **Journal of Andrology**, v.5, p. 368–378, 1992.

De LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v. 2, p. 48–54, 1997.

EID, A.; EBEID, T.; YOUNIS, H.; 2006. Vitamin E supplementation reduces dexamethason-induced oxidative stress in chicken semen. **British Poultry Science**, v.47, p. 350–356, 2006.

ERIKSSON, B.M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effect of freezing and thawing rate on the post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in FlatPack and Maxi-straws. **Animal Reproduction Science**, v. 63, p. 205–220, 2000.

ERIKSSON, B.M.; PETERSSON, H., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Field fertility with exported boar semen frozen in the new flatpack container. **Theriogenology** v. 58, p. 1065–1079, 2002.

ESKENAZI, B.; KIDD, S.A.; MARKS, A.R.; SLOTER, E.; BLOCK, G.; WYROBEK, A.J. Antioxidant intake is associated with semen quality in healthy man. **Human Reproduction**, v.20, p. 1006–1012, 2005.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. Agrobiodiversity: the case for conserving domestic and related animals. FAO Fact sheet on the conservation of domestic animal genetic resources, 1993. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/v1650t/v1650t0y.htm>.> Acesso em: 13 nov. 2012.

FORD, W.C. Regulation of sperm functions by reactive oxygen species. **Human Reproduction Update**, v.10, p. 387–399, 2004.

FLESCH F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes**, v. 1469, p. 197–235, 2000.

FRANKEL, E.N.; HUANG, S.W.; AESCHBACH, R.; PRIOR, E. Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, p. 131–135, 1996.

FUNAHASHI, H.; SANO, T. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 degrees C. **Theriogenology**, v.63, p. 1605–1616, 2005.

GADEA, J.; SELLES, E.; MARCO, M.A.; COY, P.; MATAS, C.; ROMAR, R.; RUIZ, S. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation; Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. **Theriogenology**, v. 62, p. 690–701, 2004.

GARCIA, J.C.; DOMINGUEZA, J.C. ; PENA, F.J. ; ALEGRE, B. ; GONZALEZ, R.; CASTRO, M.J.; HABING, G.G.; KIRKWOOD, R.N. Thawing boar semen in the presence of seminal plasma: Effects on sperm quality and fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 119, p. 160–165, 2010.

GIL, L.; MASCARÓ, F.; MUR, P.; GALE, I.; SILVA, A.; GONZÁLEZ, N.; MALO, C.; CANO, R. Freezing ram semen: The effect of combination of soya and rosemary essences as a freezing extender on post-thaw sperm motility. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.91, 2010.

GONZÁLEZ, N.; GIL, L.; MARTINEZ, F.; MALO, C.; CANO, R.; MUR, P.; ESPINOSA, E. Effect of natural antioxidant rosemary in canine soya freezing extender. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p. 88, 2010.

GRIVEAU, J.F.; LE LANNOU, D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. **International Journal of Andrology**, v.20, p. 61–69, 1997.

GROßFELD, R.; SIEG, B.; STRUCKMANN, C.; FRENZEL, A.; W.M.C. MAXWELL, W.M.C. New aspects of boar semen freezing strategies **Theriogenology**, v. 70, p. 1225–1233, 2008.

GROMER, S.; EUBEL, B.L.; LEE, B.L. et al. Human selenoproteins at a glance. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.62, p. 2414–2437, 2005.

GUÉRIN, B.; POZZI, N. Viruses in boar semen: detection and clinical as well as epidemiological consequences regarding disease transmission by artificial insemination. **Theriogenology**, v.63, p.556–572, 2005.

HALLIWELL, B.; ARUOMA, O.I. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. **FEBS Letters** v.281, p. 9–19, 1991.

HERRERO, M.B.; GAGNON, C. Nitric oxide: a novel mediator of sperm function. **Journal of Andrology**, v. 22, p. 349–356, 2001.

HERRERO, M.B.; de LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Nitric oxide is a signaling molecule in spermatozoa. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, p. 419–425, 2003.

HU, L.H.; CHEN, Z.L.; XIE, Y.Y. New triterpenoid saponins from *Gynostemma pentaphyllum*. **Journal of Natural Products**, v.59, p. 1143–1145, 1996.

HU, J. H.; LI, Q.W.; ZHANG, T.; JIANG, Z.L. Effect of Gynostemma Pentaphyllum Polysaccharide on boar spermatozoa quality following freezing–thawing. **Cryobiology**, v. 59, p. 244–249, 2009.

IRVINE, D.S. Glutathione as a treatment for male infertility. **Reviews of Reproduction**, v.1,p. 6–12, 1996.

JASKO, D. P. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **Ars Veterinaria**, v. 10, p. 156-165, 1994.

JEONG, Y.J.; KIMM, K.; SONG, H. J.; KANG, E. J.; OCK, S. A.; KUMAR, B.M.; BALASUBRAMANIAN, S.; RHO, G. J. Effect of alpha-tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. **Cryobiology**, v.58, p. 181–189; 2009.

JOHNSON, L.A.; GERRITS, R.J.; YOUNG, E.P. The fatty acid composition of porcine spermatozoa phospholipids. **Biology of Reproduction**, v. 1, p. 330–334, 1969.

JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISER, P.; MAXWELL, W.M.C. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 143–172, 2000.

JOHNSON, L.A. Fertility results using frozen boar spermatozoa. In: Proceedings of the 1st international conference on deep freezing of boar semen. 1985. p. 199–222.

KAEOKET, K.; CHANAPIWAT, P.; TUMMARUK, P.; TECHAKUMPHU, M. Supplemental effect of varying L-cysteine concentrations on the quality of cryopreserved boar semen. **Asian Journal of Andrology**, v. 12, p. 760–765, 2010.

KAEOKET, K.; DONTO, S.; NUALNOY, P.; NOIPHINIT, J.; CHANAPIWAT, P. Effect of gamma-oryzanol enriched rice bran oil on quality of cryopreserved boar semen. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.74, p.1149-1153, 2012.

KARABINUS, D.S.; VOGLER, C.J.; SAACKE, R.G.; EVENSON, D.P. Chromatin structural changes in sperm after scrotal insulation of Holstein bulls. **Journal of Andrology** , v. 18, p. 549-555, 1997.

KIYOSE, C.; MURAMATSU, R.; KAMEYAMA, Y.; UEDA, T.; IGARASHI, O. Biodiscrimination of α -tocopherol stereoisomers in humans after oral administration. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 65, p. 785-789, 1997.

KODAMA, H.; KURIBAYASHI, Y.; GAGNON, C. Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. **Journal of Andrology**, v. 17, p. 151–157, 1996.

MALO, C.; GIL, L.; GONZALEZ, N.; MARTÍNEZ, F.; CANO, R.; DE BLAS, I.; ESPINOSA, E. Anti-oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: Comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). **Cryobiology**, v. 61, p. 142–147, 2010.

MALO, C.; GIL, L.; CANO, R.; MARTÍNEZ, F.; GALÉ, I. Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on boar epididymal spermatozoa during cryopreservation. **Theriogenology**, v.75, p. 1735–1741, 2011.

MALO, C.; GIL, L.; CANO, R.; GONZÁLEZ, N.; LUÑO, V. Fennel (*Foeniculum vulgare*) provides antioxidant protection for boar semen cryopreservation. **Andrologia**, v. 44, p. 710–715, 2012.

MAKKER, K.; AGARWAL, A.; SHARMA, R. Oxidative stress & male infertility. **Indian Journal Medicine Research**, v.129, p. 357–367, 2009.

MANSOUR, N.; MCNIVEN, M.A.; RICHARDSON, G.F. The effect of dietary supplement with blueberry, alpha-tocopherol or astaxanthin on oxidative stability of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) semen. **Theriogenology**, v.66, p. 373–382, 2006.

MARTI, E.; MARA, L.; MARTI, J.I.; MUÑOZ-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PEÑERIZ, J.A. Seasonal variations in antioxidant enzyme activity in ram seminal plasma. **Theriogenology**, v. 67, p. 1446–1454, 2007.

MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. **Theriogenology**, v.52, p.1353-1362, 1999.

MCINTOSH, K.A.; HARDING, J.C.; PARKER, S.; ELLIS, J.A.; APPELYARD, G.D. Nested polymerase chain reaction detection and duration of porcine circovirus type 2 in semen with sperm morphological analysis from naturally infected boars. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 18, p. 380–384, 2006.

MISHRA, D.P.; SHANA, C. Estrogen induced spermatogenic cell apoptosis occurs via the mitochondrial pathway: role of superoxide and nitric oxide. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 6181–6196, 2005.

MOOK-JUNG, I.; KIM, H.; FAN, W.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S.; NISHIJO, H.; et al. Neuroprotective effects of constituents of the oriental crude drugs, *Rhodiola sacra*, *R. sachalinensis* and *Tokaku-joki-to*, against beta-amyloid toxicity, oxidative stress and apoptosis. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, p. 1101–1104, 2002.

MOLINIA, F.C., EVANS, G., CASARES, P.I., MAXWELL, W.M.C. Effect of monosaccharides and disaccharides in tris-based diluents on motility, acrosome integrity and fertility of pellet frozen ram spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.36, p. 113–122, 1994.

MORAN, J. M.; MADEJÓN, L.; ORTEGA-FERRUSOLA, C.; PEÑA, F. J. Nitric oxide induces caspase activity in boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 70, p. 91–96, 2008.

OHSUGI, M.; FAN, W.; HASE, K.; XIONG, Q.; TEZUKA, Y.; KOMATSU, K.; et al. Active-oxygen scavenging activity of traditional nourishingtonic herbal medicines and active constituents of *Rhodiola sacra*. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 67, p. 111–119, 1999.

PAREJO, I.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; BURILLO, J.; CODINA, C. Bioguided isolation and identification of the nonvolatile antioxidant compounds from fennel (*Foeniculum vulgare* mill.) waste. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1890–1897, 2004.

PARKS, J.E.; LYNCH, D.V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, v. 29, p. 255–266, 1992.

PEGG, D.E. The History and Principles of Cryopreservation. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 20, p. 05- 14, 2002.

PEÑA, F.J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 85–98, 2003.

PEÑA, F.J.; RODRÍGUEZ MARTÍNEZ, H.; TAPIA, J.A.; ORTEGA FERRUSOLA, C.; GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, L.; MACÍAS GARCÍA, B. Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 345–349, 2009.

Du PLESSIS, S. S.; HAGENAR, K.; LAMPIAO, F. The in vitro effects of melatonin on human sperm function and its scavenging activities on NO and ROS. **Andrologia**, v.42, p. 112–116, 2010.

PONS-REJRAJI, H.; SION, B.; SAEZ, F.; BRUGNON, F.; JANNY, L.; GRIZARD, G. Role of reactive oxygen species (ROS) on human spermatozoa and male infertility. **Gynécologie Obstétrique & Fertilité**, v.37, p. 529 –535, 2009.

PURSEL, V.G.; SCHULMAN, L.L.; JOHNSON, L.A. Effect of Orvus ES Paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen–thawed boar sperm. **Journal of Animal Science**, v.47, p. 198–202, 1978.

RATNAM, D. V.; ANKOLA, D. D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D. K.; KUMAR, M. N. V. R. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, v.113, p. 189-207, 2006.

RHOADES, R; PFLANZER, R. Human Physiology, 3rd edn. Harcourt Brace and company, Orlando. 1996

RICHEIMER, S.L.; MATTHEW, W.B.; GREG, A.K.; MICHAEL, C.K.; DAVID, T.B. Antioxidant activity of lipid-soluble phenolic diterpenes from rosemary. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.73, p.507–514, 1996.

ROCA, J.; GIL, M.A.; HERNANDEZ, I.; PARRILLA, I.; VAZQUEZ, J.M.; MARTÍNEZ , E.A. Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. **Journal of Andrology**, v.25, p. 397–405, 2004.

SANTOS, R.R.; CELESTINO, J.J.H.; LOPES, C.A.P.; MELO, M.A.P.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, p. 9-15, 2008.

SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; NAGY, S.; JOHANNISON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine insemination: effects on sperm viability. **Theriogenology**, v.63, p. 1320–33, 2005.

SATORRE, M.M.; BREININGER, E.; BECONI, M.T.; BEORLEGUI, N.B. Alphatocopherol modifies tyrosine phosphorylation and capacitationlike state of cryopreserved porcine sperm. **Theriogenology**, v. 68, p. 958–965, 2007.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.38, p. 995-1014, 2005.

SÖNMEZ, M.; TÜRK, G.; YÜCE, A. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone level of Wistar rats. **Theriogenolog**, v. 63, p. 2063–2072, 2005.

STOREY, B.T. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, p. 203–213, 1997.

STRZEZEK, J.; LAPKIEWICZ, S.; LECEWICZ, M. A note on antioxidant capacity of boar seminal plasma. **Animal Science Papers and Reports**, v. 17, p. 181–188, 1999.

STRZEZEK, R.; KOZIOROWSKA-GILUN, M.; KOWALÓWKA, M.; STRZEZEK, J. Characteristics of antioxidant system in dog semen. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v.12, p.55–60, 2009.

TAYLOR, K.; ROBERTS, P.; SANDERS, K.; BURTON, P. Effect of anti-oxidant supplementation of cryopreservation medium on post-thaw integrity of human spermatozoa. **Reproductive Biomedicine Online**, v.2, p.184–189, 2009.

THURSTON, L.M.; SIGGINS, K.; MILEHAM, A.J.; WATSON, P.F.; HOLT, W.V. Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 545–554, 2002.

ZHANG, Y.; LIU, Y. Study on effects of salidroside on lipid peroxidation on oxidative stress in rat hepatic stellate cells [artigo em chinês]. **Zhong Yao Cai**, v. 28, p. 794–796, 2005.

ZHAO, H.W.; LI, Q.W.; NING, G.Z.; HAN, Z.S.; JIANG, Z.L.; Duan, Y.F. Rhodiola sacra aqueous extract (RSAE) improves biochemical and sperm characteristics in cryopreserved boar semen. **Theriogenology**, v. 71, p. 849–857, 2009.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60, p. 481-492, 2000.

WABERSKI, D.; WEITZE, K.F.; GLEUMES, T.; SCHWARZ, M.; WILLMEN, T, et al. Effect of time of insemination relative to ovulation on fertility with liquid and frozen boar semen. **Theriogenology**, v.42, p. 831–840, 1994.

WHITE, I.G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. **Reproduction, Fertility and Development**, v.5, p.639–58, 1993.

WONGTAWAN, T.; SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; CABALLERO, I.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Fertility after deep intra-uterine artificial insemination of concentrated low-volume boar semen doses. **Theriogenology**, v.65, p. 773–787, 2006.

WOELDERS, H.; MATTHIJS, A.; DEN BESTON, M. Boar variation in “freezability” of the semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v.31, p. 153–159, 1996.

WUERGES, J.; LEE, J.W.; YIM, Y.I.; YIM, H.S.; KANG, S.O.; DJINOVIC CARUGO, K. Crystal structure of nickel-containing superoxide dismutase reveals another type of active site. **Proceedings of National Academy of Sciences USA**, v.101, p. 8569-8574, 2004.

YAMAMOTO, Y.; OMORI, M. Anti-oxidative activity of egg yolk lipoproteins. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.58, p. 1711–1713, 1994.

YAMAGUCHI, S.; FUNAHASHI, H. Effect of the addition of beta -mercaptoethanol to a thawing solution supplemented with caffeine on the function of frozen-thawed boar sperm and on the fertility of sows after artificial insemination. **Theriogenology**, v.77, p. 926–932, 2012.

4. Artigo 2 - Azeite de Oliva como aditivo para a criopreservação de sêmen

suíno

RESUMO – A criopreservação de sêmen é importante auxiliar em programas de melhoramento genético. Contudo, o congelamento e descongelamento promovem o estresse oxidativo, fenômeno relevante em suínos que possuem gametas sensivelmente afetados pelas espécies reativas de oxigênio (ERO). Logo, nos últimos anos a pesquisa com antioxidantes foi intensa, sendo crescente o estudo de antioxidantes naturais. O azeite de oliva contém uma mistura de antioxidantes naturais que atuam na neutralização de ERO, podendo ser um aditivo na criopreservação de sêmen. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do azeite de oliva na criopreservação de sêmen suíno. Utilizou-se 18 machos para a coleta de sêmen, totalizando 21 ejaculados. Após a coleta ocorria diluição (1:1) (v/v) em diluente *Beltsville Thawing Solution* (BTS) e avaliação de motilidade, sendo que as doses com motilidade igual ou superior a 70% eram avaliadas quanto à integridade de membrana, acrossoma e funcionalidade de mitocôndria e posteriormente congeladas. Para o congelamento, o sêmen era diluído nos tratamentos: controle (Con) (lactose-gema), 0,25% (T1); 0,50% (T2); 0,75% (T3) e 1,0% (T4) de azeite de oliva da variedade “Koroneiki”. Em seguida, realizava-se o envase em palhetas de 0,25 mL com a concentração de $5 \cdot 10^7$ espermatozoides/mL, as quais eram congeladas e armazenadas em nitrogênio líquido. O descongelamento ocorria em banho maria a 37°C, por 30 segundos e avaliava-se: a integridade de DNA, a produção de ERO, a capacidade antioxidante total e a penetração *in vitro*, além das mesmas avaliações realizadas pré-congelamento. Utilizando-se o software STATISTIX 9.0 (2008) as variáveis foram submetidas ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk que indicou ausência de normalidade. Assim, as médias foram comparadas pelo teste Kruskal-Wallis. Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os tratamentos contendo azeite e o controle para todas as variáveis analisadas. Finalmente, o azeite de oliva não incrementou os parâmetros de qualidade seminal pós-descongelamento, além de não diminuir a produção de ERO e não aumentar a capacidade antioxidante total.

Palavras-chave: Estresse oxidativo. Antioxidante. Descongelamento.

Abstract – Cryopreservation of semen is important to assist in breeding programs. However, the freezing and thawing promote oxidative stress, relevant phenomenon in pigs that possess gametes substantially affected by reactive oxygen species (ROS). Therefore, in recent years research on antioxidants has been intense, with growing study of natural antioxidants. Olive oil contains a blend of natural antioxidants that act in the neutralization of ROS, which may be an additive in semen cryopreservation. The aim of this study was to evaluate the effect of olive oil on cryopreservation of boar semen. Thus, was used 18 males for semen collection, totaling 21 ejaculates. After collection occurred dilution (1:1) (v / v) in diluent Beltsville Thawing Solution (BTS) and evaluating motility, and doses motility equal or over than 70% were evaluated for membrane integrity, and acrosome functionality of the mitochondria and subsequently frozen. For freezing, semen was diluted in treatments: control (Con) (lactose-yolk), 0.25% (T1), 0.50% (T2), 0.75% (T3) and 1.0% (T4) of the olive variety "Koroneiki". Then the filling was realized in 0.25 ml straws with the concentration of $5 \cdot 10^7$ sperm / mL, which were frozen and stored in liquid nitrogen. Thawing occurred in a water bath at 37 ° C for 30 seconds and evaluated: the integrity of DNA, the ROS generation, the total antioxidant capacity and in vitro penetration, beyond of the same evaluations pre-freezing. Using the software STATISTIX 9.0 (2008) variables were tested with the Shapiro-Wilk normality indicated that lack of normality. Thus, the means were compared by the Kruskal-Wallis test. There was no statistical difference ($p > 0.05$) among treatments containing oil and control for all variables. Finally, olive oil did not increase the parameters of post-thaw sperm quality, and not decrease ROS production and not increase the total antioxidant capacity.

Key-words: Oxidative stress. Antioxidant. Thaw

4.1. Introdução

O sêmen suíno congelado não é utilizado em nível de produção de forma tão eficiente quanto o sêmen resfriado devido à alta susceptibilidade dos espermatozoides a danos durante o processo de criopreservação (JOHNSON et al., 2000). Assim, 99% da produção de sêmen suíno é preservada apenas através do resfriamento, método que assegura um período de armazenamento de no máximo sete dias (JOHNSON et al., 2000). Contudo, para o intercâmbio internacional de material genético e geração de bancos de germoplasma o armazenamento prolongado através da criopreservação trata-se de um pré-requisito fundamental (Großfeld et al., 2008). Dessa forma, justifica-se a busca de novas estratégias visando a diminuição de danos espermáticos, para uma melhor qualidade seminal pós-descongelamento (BAILEY et al., 2008).

Os processos de congelamento e descongelamento geram um aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e conseqüentemente um estresse oxidativo (CHATTERJEE e GAGNON, 2001). Espécies reativas de oxigênio (EROs) estão envolvidas em importantes processos da fisiologia espermática como a hiperativação, capacitação, reação acrossômica e eventos de ligação à zona pelúcida (KODAMA et al., 1996; De LAMIRANDE et al., 1997; HERRERO et al., 2003). Todavia, o excesso de ERO gera o “estresse oxidativo” que provoca efeitos prejudiciais à membrana plasmática (FORD, 2004), à integridade do DNA

(BAUMBER et al., 2003), uma redução da capacidade de fusão com o oócito (GRIVEAU e Le LANNOU, 1997) e queda da motilidade, viabilidade e peroxidação lipídica das membranas dos espermatozoides (BUCAK et al., 2007).

Os espermatozoides suínos são especialmente sensíveis ao estresse oxidativo, pois possuem um elevado teor de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) nos fosfolípidos da membrana e um baixo nível na proporção colesterol: fosfolípídeos de membrana (JOHNSON et al., 1969; PARKS et al., 1992), além de uma atividade antioxidante baixa no plasma seminal suíno que poderia favorecer os danos oxidativos ainda *in vivo* (BREZEZINSKA-SLEBODZINSKA et al., 1995).

Nesse contexto, a pesquisa com antioxidantes tem sido intensa nos últimos anos, Großfeld et al. (2008) concluiu que a adição de hidroxitolueno butilado (BHT), catalase, GSH SOD, e vitamina E (ou seu análogo Trolox) aos diluentes de congelamento de sêmen suíno pode melhorar a sobrevivência de espermatozoides suínos pós descongelamento. Contudo, existem poucos relatos sobre os efeitos de antioxidantes naturais em espermatozoides. Desse modo, há um interesse crescente na pesquisa com esse tipo de antioxidante devido aos problemas de segurança e toxicidade de alguns antioxidantes sintéticos como o hidroxianisol butilado (BHA) e o propil galato (PG) (MALO et al., 2011).

O azeite de oliva trata-se de um óleo extraído do fruto colhido da oliveira (*Olea europaea*) através de processos mecânicos. A forma de extração torna o

azeite diferente de outros óleos vegetais, que geralmente utilizam solventes na extração (BACCOURI et al., 2008). O azeite de oliva contém uma grande quantidade de antioxidantes naturais que asseguram a estabilidade oxidativa durante o armazenamento (MINIOTI e GEORGIU, 2008). Dentre os compostos antioxidantes presentes no azeite tem-se os tocoferóis, esteróis, carotenóides e compostos fenólicos, sendo os o-di-hidroxi-fenólicos potentes antioxidantes (BOSKOU, BLEKAS, & TSIMIDOU, 2005).

A viabilidade de utilizar antioxidantes presentes em óleos foi demonstrada por Kaeoket et al. (2012) quando utilizou óleo de farelo de arroz para o congelamento de sêmen suíno, por conter o antioxidante gama-orizanol, e encontrou uma porcentagem significativamente maior de motilidade progressiva, viabilidade e integridade acrossomal nos grupos suplementados em relação ao controle (lactose-gema).

Segundo Catalfo et al., (2008) a suplementação da dieta de ratos com azeite de oliva incrementou os níveis de antioxidantes testiculares. Contudo, a ação antioxidante do azeite adicionado ao diluente para a criopreservação de sêmen suíno não possui dados publicados.

Desse modo, a adição de azeite de oliva ao diluente de congelamento, poderia neutralizar a produção de EROs por conter uma mistura de antioxidantes.

Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a influência do azeite de oliva como aditivo na criopreservação de sêmen suíno.

4.2. Materiais e Métodos

4.2.1. Animais e coleta de sêmen

Utilizou-se 18 machos suínos, totalizando 21 ejaculados. Os machos eram mantidos em uma granja comercial na cidade de Teutônia/ Rio Grande do Sul, sob as mesmas condições de sanidade e nutrição. A coleta ocorreu pela técnica da mão enluvada em frascos de 10 mL aquecidos a 38 °C e cobertos com filtro para separação da fração gelatinosa (HANCOCK & HOVEL, 1959). Logo após a coleta, o sêmen era diluído 1:1 (v/v) em condições isotérmicas no diluente *Beltsville Thawing Solution* (BTS) (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO – EUA). Após a diluição, o sêmen era acondicionado à 17°C e enviado à Pelotas/Rio Grande do Sul para o processo de criopreservação. Apenas as amostras que apresentavam no mínimo 70% de motilidade após a diluição em BTS eram utilizadas para a criopreservação.

4.2.2. Análises de qualidade espermática pré-congelamento

4.2.2.1. Motilidade

A motilidade foi avaliada segundo BEARDEN & FUQUAY, 1997; CBRA, 1998 pela visualização em microscopia óptica em aumento de 200x, de uma alíquota de 20µL em uma lâmina coberta por lamínula, ambas previamente aquecidas a 37 °C.

4.2.2.2. Integridade de membrana plasmática

A integridade de membrana plasmática foi avaliada conforme Harrison & Vickers (1990) através das sondas fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) (C4916-25mg, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) e Iodeto de Propídio (IP) (P4170-1g, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA),. Esta avaliação foi feita em aumento de 400x em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, América INC, São Paulo, SP), utilizando filtro WU com excitações de 450-490nm e emissão de 516 (CFDA) e 617nm (IP). As células que apresentavam fluorescência verde foram consideradas íntegras, enquanto as células com fluorescência vermelha ou verde e vermelha foram consideradas lesadas.

4.2.2.3. Integridade de acrossoma

Para a avaliação da integridade de acrossoma, foi realizado o protocolo modificado de Kawamoto et al. 1999 : Inicialmente, amostras de 20 µL foram colocadas sobre lâmina de microscopia e um esfregaço realizado. Após a secagem, essa lâminas foram coradas com 20 µL de solução de IP (40 µl de IP em 960 µl de

solução de citrato de sódio 2,94%) e após secarem novamente essas lâminas foram fixadas em álcool etílico absoluto (459844-1L, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) por 5min e lavadas em PBS (*Phosphate Buffer Saline*). Em uma sala escura, adicionaram-se às lâminas, 20 µl do Conjugado de Lectina de *Arachis hypogaea* FITC (20mg/mL) (L7381-1mg, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA) e aguardou-se 10 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água deionizada e drenadas. Após esse procedimento, colocou-se sobre a lâmina uma lamínula e uma gota de óleo de imersão sobre a última para avaliação em aumento de 1000 x, em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, América INC, São Paulo, SP), em filtro WU com excitações de 450-490nm e emissão de 520nm, contando-se 100 células. Foram consideradas células com acrossomas íntegros aquelas que apresentassem fluorescência verde no acrossoma e com morfologia normal (lisa), enquanto que células coradas em verde com morfologia anormal (rugosa, representando o acrossoma reagido) ou coradas apenas em vermelho (representando ausência de acrossoma) eram consideradas com acrossoma lesado.

4.2.2.4. Funcionalidade de Mitocôndria

A funcionalidade mitocondrial foi avaliada com o uso de uma sonda específica, Rodamina 123 (Rh123) (R8004-5mg, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA), juntamente com IP para a discriminação entre os espermatozoides vivos e mortos segundo protocolo modificado de Grasa et al. (2004). Uma alíquota

de 20µL de sêmen foi adicionada em um microtubo de 1,5 mL e a esta alíquota adicionou-se 30µL de uma solução de trabalho contendo: 960 µL de solução de citrato de sódio (2,94%), 10 µL de formaldeído (1,7mM), 10 µL de IP (7,3mM) e 20 µL de Rh123 (0,2mM). As células foram avaliadas em aumento de 400x em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, América INC, São Paulo, SP), em filtro WU com excitações de 450-490 nm e emissão de 516 – 617 nm. As células que apresentavam a peça intermediária com uma intensa fluorescência verde foram consideradas com mitocôndrias integras (funcionalmente ativas), enquanto as células com baixa fluorescência verde (foscas) na peça intermediária foram consideradas não funcionais.

4.2.3. Processamento e criopreservação do sêmen

Um volume de 15 mL do ejaculado diluído em BTS era centrifugado durante 10 minutos a 800g. O sobrenadante era descartado e o *pellet* ressuspenso com 400 µL de diluente de resfriamento (DR), com osmolaridade de 355 mOsm e pH de 7,2, que continha 80% (v/v) de solução de lactose a 11% (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO – USA) e 20 mL de gema de ovo (v/v).

Posteriormente, esses 400 µL eram divididos em 4 microtubos de 1,5 mL com 100 µL cada para diluição nos tratamentos: Con (apenas DR); T1 (0,25 % de azeite

de oliva em DR); T2 (0,5% de azeite de oliva em DR); T3 (0,75% de azeite de oliva em DR) e T4 (1,0% de azeite de oliva em DR). O azeite utilizado era da variedade Koroneiki, cedido por uma integrante do programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial (PPGCTA) na Universidade Federal de Pelotas. Para a extração do azeite, os frutos foram colhidos de oliveiras cultivadas na cidade de Bagé/RS, processados mecanicamente à frio com extrator Spremoliva (Oliomio/Itália). A determinação dos compostos antioxidantes foi realizada por integrantes do PPGCTA, através de espectrofotometria para determinação dos fenóis e carotenóides totais e cromatografia líquida (HPLC) para os tocoferóis totais, sendo estes compostos demonstrados na tabela 1. Após a diluição nos tratamentos o sêmen era refrigerado à 5 °C, em geladeira, permanecendo a essa temperatura durante 90 minutos.

Passado esse período a 5° C, o sêmen era diluído em diluente de congelamento (DC) contendo 83,5% de DR; 1,5% de *Orvus Ex Paste* (Equex-Paste®, Nova Chemical Sales, MA – USA) e 15 % do crioprotetor N,N Dimetilacetamida (C₄H₉NO) v/v (DMA, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). A adição do DC ocorria na proporção 1:2, ou seja, para cada 2 mL de DR adicionava-se 1 mL de DC para que o DMA apresentasse uma concentração final de 5% (BIANCHI et al., 2008). Ao final desta diluição em DC, cada tratamento possuía uma concentração necessária para que cada palheta de 0,25 mL onde o sêmen foi

envasado contivesse 5×10^7 espermatozoides/mL. Após o envase, as palhetas foram mantidas à 5 cm do vapor de nitrogênio durante 10 minutos. Em seguida essas palhetas foram submersas e armazenadas em nitrogênio líquido à -196°C .

Tabela 1 - Compostos antioxidantes presentes no azeite de oliva variedade Koroneiki

| Variedade | Fenóis Totais (mg/Kg) | Carotenóides Totais (mg/Kg) | Tocoferóis (mg/Kg) | |
|-----------|--------------------------|--------------------------------|--------------------|--------------------------|
| | | | Alfa- α | Gama $\gamma + \beta$ |
| Koroneiki | 112,2 \pm 1,3 | 6,5 \pm 0,05 | 39,5 \pm 1,6 | 1,1 \pm 0,01 |

4.2.4. Descongelamento

Após 7 dias de armazenamento em nitrogênio líquido, as palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos e seu conteúdo armazenado em tubos cônicos contendo 2,5 mL de BTS, previamente aquecido a 37°C (MAXWELL e JOHNSON, 1997; PEÑA et al., 2003). O sêmen descongelado era incubado por 10min e as análises de qualidade espermática realizadas.

4.2.5. Análises de qualidade espermática pós-descongelamento

Após o descongelamento realizou-se as análises de motilidade, integridade de membrana, acrossoma, funcionalidade de mitocôndria, sendo essas conduzidas pela mesma metodologia empregada para o sêmen pré-congelamento.

Além das mesmas análises realizadas pré-congelamento, também realizou-se as análises descritas a seguir:

4.2.5.1. Integridade de DNA

Para esta avaliação adicionou-se uma alíquota de 20 μL de sêmen o volume de 10 μL do tampão TNE (0.01 M Tris-HCl; 0.15 M NaCl; 0.001 M EDTA; pH 7,2), após 30 segundos adicionando-se 20 μL de solução do detergente Triton 1x e passados mais 30 segundos adicionando-se 10 μL of acridine orange (2mg/mL em H_2O deionizada). A avaliação de integridade de DNA ocorreu após 5 minutos da adição dos reagentes ao sêmen em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, América INC, São Paulo, SP). Esta avaliação ocorreu pela contagem de 100 células, considerando-se células com DNA lesado aquelas apresentando fluorescência laranja e íntegras aquelas apresentando fluorescência verde conforme descrito por Varela et al. (2012).

4.2.5.1. Produção de espécies reativas de oxigênio

A quantificação de espécies reativas de oxigênio (ERO) no sêmen descongelado foi realizada por teste de cinética ERO, modificado de Myhre e Fonnum (2001), através de um fluorímetro (Victor 2, Perkin Elmer). Após o descongelamento, 500 μL do sêmen foi depositado em microtubos de 1,5 mL, os quais eram centrifugados uma vez a 800 g por 10min com descarte do sobrenadante e ressuspensão do *pellet* com 600 μL do preparo da sonda fluorescente 2'7'Diacetato de Diclorofluoresceína $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ (40 μM em PBS) (35845-1g, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). O sêmen permanecia em contato com a sonda

durante 30min em local escuro a 36°C. Após esse período, 160 µL das amostras eram adicionadas a placas brancas de 96 poços para análises de fluorescência. Essa leitura ocorreu durante 30 min, através de 8 ciclos (8 repetições), com intervalo de 4min entre cada ciclo. Este método baseou-se na capacidade da sonda H₂DCF-DA atravessar passivamente a membrana onde o acetato é clivado pelas esterases intracelulares. Em seguida, o composto não fluorescente H₂DCF é oxidado pelas ERO, para o composto fluorescente DCF. A fluorescência foi mensurada através do fluorímetro usando comprimentos de onda de excitação de 488 nm e um comprimento de onda de emissão de 529 nm. A geração de EROs foi determinada através da integração da área da curva de fluorescência pelo tempo, sendo os resultados expressos por UFx10⁵.

4.5.2.2. Capacidade Antioxidante Total

Para análise da capacidade antioxidante total (CAT) utilizou-se a metodologia de Amado et al. (2009). Para tanto, 500 µl de sêmen descongelado foi adicionado a microtubos de 1,5 mL e estes tubos foram congelados (-18°C). Após uma semana, as amostras separadas para análise da CAT foram descongeladas e sonicadas por 5 segundos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 800 g por 10min e o *pellet* desprezado, sendo o sobrenadante utilizado para as análises. Em uma placa branca de 96 poços foi adicionado 125 µl de tampão de reação (PBS), sendo acrescido uma alíquota de 10 µl de cada amostra de sêmen em 4 poços. Em dois

poços eram acrescentados 7,5 µl de água Milli-Q e nos outros dois, 7,5 µl de solução de 2,2' -azobis (2-metilpropionamidina) dihidroclorato ABAP (20 µM), sendo as amostras feitas em duplicatas. Em seguida eram adicionados 10 µl de solução da sonda H2DCF-DA (16 µM) em cada poço para leitura no fluorímetro, durante 30 minutos, através de 8 ciclos (8 repetições), com intervalo de 4 minutos entre cada ciclo.

A capacidade antioxidante total do azeite de oliva contra os radicais peróxidos, gerados pela decomposição térmica do ABAP, foi obtida pela diferença entre a área de ERO com e sem ABAP, sendo os cálculos realizados como descrito anteriormente para a análise de geração de EROs.

4.5.2.3 Teste de penetração espermática *in vitro*

Para esta avaliação, ovários de leitoas pré-púberes foram coletados em um abatedouro e transportados para o laboratório dentro de 60 min, em solução salina (0,90%) contendo gentamicina (40mg/mL) em 30 °C. No laboratório, folículos de 3-6 mm foram aspirados com o auxílio de uma bomba de vácuo e oócitos com a zona pelúcida intacta foram congelados (-18 °C) para posterior utilização. Após o descongelamento, as células do *cumulus oophorus* foram removidas mecanicamente com o auxílio de uma micropipeta de 200µL e o processamento dos

oócitos foi realizado como descrito por (MACEDO et al., 2006; MACEDO et al., 2010). O teste de penetração *in vitro* ocorreu com 30 oócitos por macho, segundo Maleszewski et al. (1995), com modificações: o meio de fertilização foi o tris modificado (mTBm) composto de: 113,1mM de NaCl, 3mM de KCl, 10mM de CaCl₂, 20mM de Tris, 11mM de glicose e 5mM de piruvato de sódio acrescido de 0,4% de BSA e 5 mM de cafeína e a co-incubação dos gametas foi realizada em microtubos de 1,5 mL com 1 mL de mTBm, em banho-maria a 37°C por 2 horas. A concentração espermática de 4.10⁶/mL. Após a co-incubação, os oócitos foram recuperados, lavados, corados com Hoechst 33342 (10mg/mL), e avaliados a 400 x em microscópio de epifluorescência (Olympus BX 51, América INC, São Paulo, SP). Finalmente, os oócitos foram considerados penetrados quando sua zona pelúcida continha pelo menos um espermatozoide no espaço perivitelíneo ou citoplasma (MACEDO et al., 2006; MACEDO et al., 2010). Para cada macho, o número de oócitos penetrados e de espermatozoides por ovócitos foram contados e a taxa de penetração *in vitro* calculada.

4.2.5. Análises Estatísticas

As variáveis de motilidade, integridade de membrana, acrossoma, DNA, funcionalidade de mitocôndria, ERO, CAT, número de espermatozoides por oócitos e taxa de penetração foram submetidas ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk, o

qual indicou ausência de normalidade. Assim, as médias para essas variáveis foram comparadas pelo teste de variância de Kruskal-Wallis, sendo todas as análises estatísticas realizadas pelo software STATISTIX 9.0 (2008).

4.3. Resultados e Discussão

As avaliações pré-congelamento determinaram que apenas para a integridade de acrossoma obteve-se uma baixa porcentagem de células íntegras – inferior a 70% (Tab. 2).

Tabela 2 – Sêmen fresco: Média e Desvio padrão para motilidade (MOT), integridade de membrana plasmática (IMP), funcionalidade de mitocôndria (FM) e integridade de acrossoma (IAC)

| Tratamento | MOT (%) | IMP (%) | FM (%) | IAC (%) |
|------------|------------|------------|------------|------------|
| Fresco | 73,8 ± 1,1 | 78,4 ± 2,5 | 87,7 ± 1,2 | 41,6 ± 7,9 |

Para o sêmen descongelado, em nenhuma das variáveis analisadas houve diferenças estatística entre os diferentes tratamentos contendo azeite de oliva e o controle ($p > 0,05$) (Tab. 3, 4 e 5). Apesar disso, nota-se que para integridade de membrana plasmática os tratamentos T2 e T3 apresentaram um valor numérico superior ao controle e aos demais tratamentos (Tab. 3). Essa tendência de proteção dos tratamentos T2 e T3 pode dever-se ao fato de que a mistura de antioxidantes

presentes no azeite de oliva efetuou uma proteção à membrana por neutralizar EROs e conseqüentemente diminuir a peroxidação lipídica.

Uma inibição da peroxidação lipídica em espermatozoides suínos pós-descongelamento foi relatada por Malo et al. (2011). Esse autor verificou que os antioxidantes presentes no vegetal *Rosmarinus officinalis* diminuíram a formação de malonaldeído (MDA), um produto da peroxidação lipídica das membranas biológicas. Nesse contexto, seria interessante, futuramente, a avaliação dos efeitos do azeite de oliva sobre a peroxidação lipídica das membranas espermáticas através de ensaios específicos.

A motilidade espermática apresentou níveis inferiores a 20% em todos os tratamentos e em torno de 20% para o controle (Tab. 3). Essa queda na motilidade era esperada, pois essa variável é sensivelmente afetada pela geração de EROs durante o processo de congelamento (ARMSTRONG et al., 1999). Além disso, sendo a atividade mitocondrial necessária para fornecer ATP e possibilitar a motilidade espermática (KAEOKET et al., 2010), a baixa motilidade apresentada pelo controle e demais tratamentos pode ter sido ocasionada pela baixa porcentagem de mitocôndrias funcionais (Tab. 3).

Além do decréscimo na motilidade, tem-se relatado que o aumento de EROs durante o congelamento produz fragmentação de DNA (FRASER e STRZEZEK, 2007; WHITAKER et al., 2008). Contudo, a integridade de DNA surpreendentemente

mostrou taxas acima de 80% para o controle e todos os tratamentos (Tab. 3). A manutenção da integridade do DNA pode dever-se ao fato de que um dos antioxidantes presentes no azeite de oliva, o tocoferol, o qual já foi relatado por Casey et al. (2011) como sendo capaz de diminuir a fragmentação de DNA. Nesse contexto, nota-se que T2, T1 e T4 apresentaram respectivamente maiores valores numéricos para a integridade de DNA em relação ao controle, apesar de não haver diferença estatística ($p>0,05$) (Tab. 3).

Tabela 3- Sêmen descongelado: Média e erro padrão da média para motilidade (MOT), integridade de membrana plasmática (IMP), funcionalidade de mitocôndria (FM) e integridade de DNA (IDNA)

| Tratamento | MOT (%) | IMP (%) | FM (%) | IDNA (%) |
|------------|----------|----------|----------|----------|
| Con | 21,1±3,1 | 52,3±9,1 | 47,7±5,1 | 87,7±5,4 |
| T1 | 14,0±2,1 | 49,5±7,1 | 50,5±5,4 | 89,9±5,8 |
| T2 | 14,7±2,2 | 63,2±5,7 | 40,7±6,2 | 91,7±4,7 |
| T3 | 13,5±2,0 | 65,4±6,2 | 40,8±5,8 | 82,6±7,2 |
| T4 | 14,0±2,3 | 52,9±6,8 | 40,2±4,8 | 88,4±4,9 |

Con – lactose-gema; T1: 0,25% azeite de oliva; T2: 0,50% de azeite de oliva; T3: 0,75% de azeite de oliva; T4: 1,0% de azeite de oliva.

A integridade de acrossoma obteve grande decréscimo pós-descongelamento, com valores inferiores a 10% para o controle e demais tratamentos (Tab. 4), contudo esse resultado era esperado uma vez que pré-congelamento (Tab. 2) essa variável apresentava níveis baixos de integridade (inferiores a 70%).

Para o teste de penetração *in vitro* (PIV), no que se refere ao número de espermatozoides e à taxa de penetração, o tratamento T1 apresentou uma tendência de preservação do potencial fertilizante pós-descongelamento obtendo as maiores médias em relação ao controle e aos demais tratamentos, sem, contudo, se diferir estatisticamente ($p>0,05$) (Tab. 4). O desempenho no teste de PIV da concentração de 0,25% (T1) é interessante, pois testes que avaliam a interação entre espermatozoide e oócito são mais preditivos de fertilidade em relação aos testes que avaliam apenas o espermatozoide (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003; GADEA, 2005).

Tabela 4 – Sêmen Descongelado: Média e erro padrão da média para integridade de acrossoma (IAC), número de espermatozoides (NE) e taxa de penetração (TP).

| Tratamento | IAC (%) | NE | TP |
|------------|-----------|-----------|------------|
| Con | 8,6 ± 1,8 | 2,6 ± 0,4 | 76,9 ± 5,2 |
| T1 | 7,4 ± 1,1 | 4,4 ± 0,1 | 83,9 ± 4,6 |
| T2 | 8,4 ± 1,8 | 2,6 ± 0,3 | 73,2 ± 5,2 |
| T3 | 6,1 ± 0,9 | 3,2 ± 0,5 | 74,6 ± 3,8 |
| T4 | 8,4 ± 1,5 | 2,9 ± 0,5 | 73,1 ± 4,1 |

Con – lactose-gema; Con – lactose-gema; T1: 0,25% azeite de oliva; T2: 0,50% de azeite de oliva; T3: 0,75% de azeite de oliva; T4: 1,0% de azeite de oliva.

Devido à mistura de antioxidantes presentes no azeite de oliva (MINIOTI e GEORGIU, 2008), esperava-se uma queda na produção de ERO dos tratamentos contendo o azeite de oliva em relação ao controle. Ainda, era esperado que o aumento da concentração de azeite gerasse uma queda na produção de ERO. Todavia, mesmo sem diferença estatística ($p>0,05$), surpreendentemente, o

tratamento T4 (contendo maior concentração de azeite de oliva) apresentou os maiores níveis de ERO (Tab. 5). Por outro lado, os tratamentos T2 e T3 apresentaram numericamente os melhores desempenhos, enquanto o tratamento T1 assemelhou-se ao controle (Tab. 5). Um fato interessante é o de que o tratamento T4 que apresentou maior produção de ERO foi aquele com uma das mais baixas taxas de penetração espermática *in vitro* (PIV), ao passo que o tratamento T1 obteve os maiores valores de número de espermatozoides e taxa de penetração no teste de PIV, indicando uma relação indireta entre estresse oxidativo e potencial fertilizante. Além disso, os tratamentos com menor produção de ERO (T2 e T3 – Tab. 5) foram aqueles que obtiveram os mais altos índices de membranas íntegras (Tab. 3), reforçando o indício de que os antioxidantes possivelmente neutralizaram ERO e diminuíram a peroxidação lipídica, diminuindo os danos de membrana.

Outro ensaio para avaliar a capacidade antioxidante do azeite de oliva foi o teste de capacidade antioxidante total (CAT) contra os radicais peróxidos. Assim, esperava-se que o azeite gerasse um aumento da CAT. Contudo, os tratamentos contendo azeite não diferiram do controle na capacidade de neutralizar os radicais peróxidos (Tab. 5). Entretanto, nota-se que o tratamento de T3 apresentou numericamente um valor superior de CAT em relação ao controle e demais tratamentos. É importante ressaltar que o mesmo tratamento já havia apresentado

um dos mais baixos valores na produção de ERO, bem como um dos maiores valores para integridade de membrana plasmática.

Tabela 5 - Sêmen Descongelado: Média e erro padrão da média para produção de Espécies reativas de oxigênio (ERO) e Capacidade antioxidante total (CAT), expressas pela área por unidade de fluorescência.

| Tratamento | ERO | CAT |
|------------|-------------------------|---------------------------|
| Con | $3,3.10^5 \pm 0,7.10^5$ | $2,2.10^5 \pm 0,6.10^5$ |
| T1 | $3,2.10^5 \pm 0,6.10^5$ | $2,1.10^5 \pm 0,7.10^5$ |
| T2 | $2,8.10^5 \pm 0,6.10^5$ | $2,4.10^5 \pm 0,8.10^5$ |
| T3 | $2,9.10^5 \pm 0,4.10^5$ | $30,0.10^5 \pm 27,9.10^5$ |
| T4 | $4,4.10^5 \pm 1,3.10^5$ | $2,0.10^5 \pm 0,6.10^5$ |

Con – lactose-gema; Con – lactose-gema; T1: 0,25% azeite de oliva; T2: 0,50% de azeite de oliva; T3: 0,75% de azeite de oliva; T4: 1,0% de azeite de oliva.

Finalmente, para os espermatozoides suínos pós-descongelamento o azeite de oliva não apresentou relevância como antioxidante. Contudo, uma perspectiva de estudo seria a avaliação do azeite de oliva adicionado ao diluente de resfriamento, para prolongar a vida útil do sêmen resfriado, pois se verificou tendências de proteção à membrana, de diminuição de ERO e maior capacidade antioxidante total nas concentrações de 0,5 (T2) e 0,75% (T3).

Além disso, as altas taxas apresentadas no teste de PIV pela concentração de 0,25% (T1) reforçam a tendência antioxidante do azeite de oliva. Por fim, além da aplicação do azeite de oliva para o resfriamento de sêmen, a avaliação de outras variedades além da Koroneiki seria válida, pois segundo Minioti e Georgiou (2008) a

composição dos antioxidantes mais potentes, os fenóis, é variável entre diferentes azeites de oliva.

4.4. Conclusão

O azeite de oliva não gerou incremento dos parâmetros de qualidade seminal pós-descongelamento, além de não diminuir a produção de ERO e não aumentar a capacidade antioxidante total.

4.5. Referências

AMADO, L.L.; GARCIA, M.L.; RAMOS, P.B.; FREITAS, R.F.; ZAFALON, B.; FERREIRA, J.L.R.; YUNES, J.S.; MONSERRAT, J.M. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. **Science of the Total Environment**, v.407, p. 2115 – 2123, 2009.

ARMSTRONG, J. S.; RAJASEKARAN, M.; CHAMULITRAT, W.; GATTI, P.; HELLSTROM, W. J.; SIKKA, S. C. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. **Free Radical Biology & Medicine**, v.26, p. 1377–1390, 1999.

BACCOURI, O.; BENDINI, A.; CERRETANI, L.; GUERFEL, M.; BACCOURI, B.; LERCKER, G.; ZARROUK, M.; BEN MILED, D.D. Comparative study on volatile compounds from Tunisian and Sicilian monovarietal virgin olive oils. **Food Chemistry**, v.111, p.322-328, 2008.

BAILEY, J. L.; LESSARD, C.; JACQUES, J.; BRE`QUE, C.; DOBRINSKI, I.; ZENG, W.; GALANTINO-HOMER, H. L. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. **Theriogenology**, v.70, p. 1251–1259, 2008.

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J.; MEYERS, S.A. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 24,p. 621–628, 2003.

BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. Semen evaluation. In: BEARDEN, H.J.; FUQUAY, J.W. Applied Animal Reproduction. 4th Ed. New Jersey: Prentice Hall, 1997. p. 159-170.

BIANCHI, I.; CALDERAM, K.; MASCHIO, É.F.; MADEIRA, E.M.; ULGUIM, R.R.; CORCINI, C.D.; BONGALHARDO, D.C.; CORRÊA, É.K.; LUCIA JR., T.; DESCHAMPS, J.C.; CORRÊA, M.N. Evaluation of amides and centrifugation temperature in boar semen cryopreservation. **Theriogenology**, v.69, p. 632-638, 2008.

BOSKOU, D.; BLEKAS, G.; TSIMIDOU, M. Phenolic compounds in olive oil and olives. **Current Topics in Nutraceutical Research**, v.3, p. 125–136, 2005.

BUCAK, M.N.; ATESSAHIN, A.; VARISH, O.; YUCE, A.; AKCAY, A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. **Theriogenology**, v. 67, p. 1060–1067, 2007.

BREZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E.; SLEBODZINSKI, A.B.; PIETRAS, B.; WIECZOREK, G. Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. **Biological Trace Element Research**, v.47, p. 69–74, 1995.

CASEY, S. J.; TAUPIER, R.; WHITAKER, B. D. Effects of anti-lipid peroxidases on frozen-thawed boar spermatozoa. **In Vitro Cellular & Developmental Biology—Animal**, v.47, p. 350–354, 2011.

CATALFO, G. E. H.; ALANIZ, M. J. T.; MARRA, C.A. Dietary lipids modify redox homeostasis and steroidogenic status in rat testis. **Nutrition**, v.24, p. 17–726, 2008.

CBRA. 1998. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2ª Ed. Belo Horizonte: CBRA, 49.

CHATTERJEE, S.; GAGNON, C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v.59, p.451–458, 2001.

De LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v. 2, p. 48–54, 1997.

FORD, W.C. Regulation of sperm functions by reactive oxygen species. **Human Reproduction Update**, v.10, p. 387–399, 2004.

FRASER, L.; STRZEZEK, J. Is there a relationship between the chromatin status and DNA fragmentation of boar spermatozoa following freezing-thawing? **Theriogenology**, v.68, p. 248–257, 2007.

FUNAHASHI, H.; SANO, T. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 degrees C. **Theriogenology**, v.63, p. 1605–1616, 2005.

GADEA ,J.; GARCÍA-VAZQUEZ, F.A.; MATÍAS, C.;GARDÓN, J.C.; CÁNOVAS ,S.; GUMBAO, D. Cooling and freezing of boar spermatozoa: Supplementation of the

freezing media with reduced glutathione preserves sperm function. **Journal of Andrology**; v.26, p.396–404, 2005

GRASA, P.; PÉREZ-PÉ, R.; BÁGUENA, O.; FORCADA, F.; ABECIA, A.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A.; MUIÑO-BLANCO, T. Ram Sperm Selection by a Dextran/Swim-Up Procedure Increases Fertilization Rates Following Intrauterine Insemination in Superovulated Ewes. **Journal of Andrology**, v.25, p. 982-990, 2004.

GRIVEAU, J.F.; LE LANNOU, D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. **International Journal of Andrology**, v.20, p. 61–69, 1997.

GROßFELD, R.; SIEG, B.; STRUCKMANN, C.; FRENZEL, A.; W.M.C. MAXWELL, W.M.C. Rath New aspects of boar semen freezing strategies **Theriogenology** , v. 70, p. 1225–1233, 2008.

HANCOCK, J.L., HOVELL, G.J.R. The collection of boar semen. **Veterinary Record**, v.71,p. 664-665, 1959.

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility** , v. 88, p.343-352, 1990.

HERRERO, M.B.; de LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Nitric oxide is a signaling molecule in spermatozoa. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, p. 419–425, 2003.

JOHNSON, L.A.; GERRITS, R.J.; YOUNG, E.P. The fatty acid composition of porcine spermatozoa phospholipids. **Biology of Reproduction**, v. 1, p. 330–334, 1969.

JOHNSON, L.A.; WEITZE, K.F.; FISER, P.; MAXWELL, W.M.C. Storage of boar semen . **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 143–172, 2000.

KAEOKET, K.; SANG-URAI, P.; THAMNIYOM, A.; CHANAPIWAT, P.; TECHAKUMPHU, M. Effect of Docosahexaenoic Acid on Quality of Cryopreserved Boar Semen in Different Breeds. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45,p. 458–463, 2010.

KAEOKET, K.; DONTO, S.; NUALNOY, P.; NOIPHINIT, J.; CHANAPIWAT, P. Effect of gamma-oryzanol enriched rice bran oil on quality of cryopreserved boar semen. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.74, p.1149-1153, 2012.

KAWAMOTO, A.; KAZUTOMO, O.; KISHIKAWA, H.; ZHU, L.; AZUMA, C.; MURATA, Y. Two-color fluorescence staining of lectin and anti-CD46 antibody to assess acrosomal status. **Fertility and Sterility**, v.71, p. 497-501, 1999.

KODAMA, H.; KURIBAYASHI, Y.; GAGNON, C. Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. **Journal of Andrology**, v. 17, p. 151–157, 1996.

MACEDO JR, M.C.; DESCHAMPS, J.C.; LUCIA JR, T.; BORDIGNON, J.; SERRET, C.G.; RAMBO G.; PIVATO, I.; SCHMITT, E. In vitro penetration of fresh and vitrified swine oocytes by homologous spermatozoa using different incubation systems. **Animal Reproduction Science**, v. 92, p. 334–348, 2006.

MACEDO JR, M.C.; LUCIA JR, T.; RAMBO, G.; FERREIRA FILHO, E.B.; ROSA, A.P.; FABIANE, C.; CABRAL, M.; DESCHAMPS, J.C. In vitro penetration of swine oocytes by homologous spermatozoa: distinct systems for gamete's coincubation and oocyte's cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 117, p. 295–301, 2010.

MALESZEWSKI, M.; KLINE, D.; YANAGIMACHI, R. Activation of hamster zone-free oocytes by homologous and heterologous spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.105, p. 99–107, 1995.

MALO, C. ; GIL, L.; CANO, R.; MARTÍNEZ, F.; GALÉ, I. Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on boar epididymal spermatozoa during cryopreservation. **Theriogenology**, v.75, p. 1735–1741, 2011.

MAXWELL, W.M.C., JOHNSON, L.A., Membrane status of boar spermatozoa after cooling or cryopreservation. **Theriogenology**, v.48, p. 209-219, 1997.

MINIOTI, K. S.; GEORGIU, C. A. High throughput flow injection bioluminometric method for olive oil antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 109, p. 455–461, 2008.

MYHRE, O., FONNUM, F. The effect of aliphatic, naphthenic, and aromatic hydrocarbons on production of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in rat brain synaptosome fraction: the involvement of calcium, nitric oxide synthase, mitochondria, and phospholipase A. **Biochemical Pharmacology**, v. 62, p. 119–128, 2001.

PEÑA, F.J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRÍGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of fresh and frozen-thawed boar semen using an Annexin-V assay: a new method of evaluating sperm membrane integrity. **Theriogenology** , v.60, p. 677–689, 2003.

RODRIGUEZ-MARTINEZ H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? **Reproduction in Domestic Animals**, v.38, p.312–318, 2003.

STATISTIX® 9. **Analytical Software. User's manual**. 396 p. Tallahassee. FL. 2008.

VARELA JUNIOR, A.S.; CORCINI, C.D.; GHELLER, S.M.M.; JARDIM, R.D.; LUCIA, T.JR.; STREIT JR., D.P.; FIGUEIREDO, M.R.C. Use of amides as cryoprotectants in extenders for frozen sperm of tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Theriogenology**, v.78, p. 244-251, 2012.

WHITAKER, B. D.; CARLE, B.; MUKAI, T.; SIMPSON, A.; VU, L.; KNIGHT, J. W. Effect of exogenous glutathione supplementation on motility, viability, and DNA integrity of frozen-thawed boar semen. **Animal Reproduction**, v.5, p. 127-131, 2008.