

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
CURSO DE MESTRADO**

**GLUTATIONA REDUZIDA E CENTRIFUGAÇÃO EM  
GRADIENTE DE ÚNICA CAMADA NA LIPOPEROXIDAÇÃO  
DO SÊMEN EQUINO CRIOPRESERVADO**

**Érika Saltiva Cruz Bender**

**CAMPO GRANDE, MS  
2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
CURSO DE MESTRADO**

**GLUTATIONA REDUZIDA E CENTRIFUGAÇÃO EM  
GRADIENTE DE ÚNICA CAMADA NA LIPOPEROXIDAÇÃO  
DO SÊMEN EQUINO CRIOPRESERVADO**

Reduced glutathione and single layer centrifugation gradient on  
lipoperoxidation of cryopreserved equine sperm

**Érika Saltiva Cruz Bender**

**Orientadora: Profa. Dra. Carmem Estefânia Serra Neto Zúccari  
Co-Orientador: Prof. Dr. Marcilio Nichi**

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Mato Grosso do Sul, como  
requisito à obtenção do título de Mestre  
em Ciência Animal.  
Área de concentração: Produção Animal.

CAMPO GRANDE, MS 2014

Certificado de aprovação

**ÉRIKA SALTIVA CRUZ BENDER**

**GLUTATIONA REDUZIDA E CENTRIFUGAÇÃO EM GRADIENTE DE ÚNICA CAMADA NA  
LIPOPEROXIDAÇÃO DO SÊMEN EQUINO CRIOPRESERVADO**

Reduced glutathione and single layer centrifugation gradient on lipoperoxidation of cryopreserved  
equine sperm

Dissertação apresentada à Universidade Federal  
de Mato Grosso do Sul, como requisito à  
obtenção do título de mestra em Ciência Animal.

Área de concentração: Produção Animal.

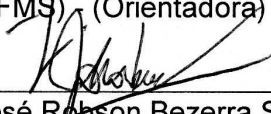
Aprovado (a) em: 14/02/2014

**BANCA EXAMINADORA:**



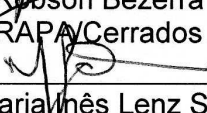
---

Doutora Carmem Estefânia Serra Neto Zúccari  
(UFMS) (Orientadora)



---

Doutor José Robson Bezerra Sereno  
EMBRAPA Cerrados



---

Doutora Maria Inês Lenz Souza  
UFMS

*A Deus, por sua grande bondade em me proporcionar a oportunidade de contribuir para o avanço da ciência e, por colocar em meu caminho valorosas pessoas, meus pais Fernando e Rosangela e meu esposo Gesian.  
Dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter me dado a vida e colocar em meu caminho mais esta oportunidade de desenvolvimento moral, intelectual e espiritual.

Aos meus pais, Fernando e Rosangela, que deram tudo de si, não medindo esforços e por vezes até abdicando de seus próprios anseios para proporcionarem sólidos alicerces ao meu desenvolvimento intelectual, me fornecendo ferramentas fundamentais para atingir mais esta conquista.

Ao meu companheiro de todos os dias, Gesian, pelo apoio, sempre me encorajando para que eu possa alcançar meus objetivos, compreensão nos momentos de ausência e ansiedade e pelo amor e carinho que recebo a cada dia, me passando tranquilidade e um querer de dias melhores. Cumprindo com nossa promessa, de fazer dos nossos sonhos realidade, para que assim nossa realidade seja sempre um sonho.

À Profa. Dra. Carmem Estefânia Serra Neto Zúccari, por cumprir com excelência a função de orientadora, com incontáveis lições acadêmicas e por seu incansável esforço em transmitir princípios éticos e morais. Reconheço que o resultado do seu trabalho vai além da orientação para a obtenção do título acadêmico em si, resultando também em uma boa formação profissional, que poderei levar por toda a vida. Pela oportunidade, confiança e amizade. Minha gratidão.

Ao Prof. Dr. Marcilio Nichi, por compartilhar seu conhecimento, que foi de grande valia para a execução deste trabalho. Pela disposição que sempre demonstrou, auxiliando quando foi preciso.

Ao doutorando Breno Fernandes Barreto Sampaio, um amigo que ganhei na pós-graduação, meus sinceros agradecimentos pelo agradável convívio, pela troca de conhecimentos, pelo apoio e principalmente pela participação ativa na execução das diversas etapas do experimento, o que foi imprescindível para a finalização satisfatória deste trabalho.

Aos hoje Médicos Veterinários Edjalma e Letícia, pela alegria e pelo auxílio na etapa laboratorial.

À Profa. Dra. Eliane Vianna da Costa e Silva, pelo apoio, sugestões e disposição em auxiliar quando foi preciso.

À Profa. Dra. Maria Inês Lenz de Souza, pelas sugestões na elaboração desta dissertação.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, que de uma forma ou de outra contribuíram para a minha formação.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (FAMEZ/UFMS), pela oportunidade.

Aos Criadores que disponibilizaram seus ganhos para que fosse possível a obtenção de amostras para este trabalho, não esquecendo também, dos Médicos Veterinários que intermediaram os contatos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos que não foram mencionados, mas que de alguma forma contribuíram e me incentivaram no decorrer do curso, minha sincera gratidão.

*Se alguém varre as ruas para viver, deve varrê-  
las como Michelangelo pintava, como Beethoven  
compunha, como Shakespeare escrevia.*

Martin Luther King

## RESUMO

BENDER, E.S.C. Glutathione reduzida e centrifugação em gradiente de única camada na lipoperoxidação do sêmen equino criopreservado. 2014. 69f. Dissertação - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2014.

Os objetivos do experimento foram avaliar o efeito antioxidante da glutathione reduzida adicionada ao sêmen equino pré-congelação, nas concentrações de 3 mM, 5 mM e 7 mM, e da centrifugação em gradiente de única camada, após a descongelação, utilizando as formulações comerciais Androcoll-E® e Equipure™, sobre os níveis de lipoperoxidação. Os ejaculados (n=19) foram congelados em diluente a base de gema de ovo (Botucio®). Foram avaliadas as variáveis espermáticas: motilidade, vigor, morfologia, viabilidade/status acrossomal, atividade mitocondrial, nível de lipoperoxidação e taxa de recuperação espermática pós-centrifugação. As médias dos tratamentos foram comparadas pelos testes de *Kruskal-Wallis*, *Bonferroni*, *Duncan* e *t de Student*, de acordo com o comportamento dos dados, e analisada a associação da lipoperoxidação com as demais variáveis, pela estimativa dos coeficientes de correlação de *Spearman*, em nível de 5% de significância. Quando comparados aos valores pós-colheita, a glutathione reduzida nas concentrações de 3 mM e 5 mM apresentou, após a descongelação, um efeito protetor contra a lipoperoxidação (710,2; 636,3 vs. 565,7 ng/10<sup>8</sup> espermatozoides; P>0,05), no entanto, a concentração de 7 mM mostrou-se tóxica, com menores médias (P<0,05) de motilidade (23% vs. 60%), vigor (1,3 vs. 2,8) e aumento da lipoperoxidação (704,5 vs. 565,7 ng/10<sup>8</sup> espermatozoides; P<0,05). Após a centrifugação em gradiente de única camada, as amostras apresentaram maiores níveis de lipoperoxidação (P<0,05), independente do gradiente utilizado. Conclui-se que, nas concentrações de 3 mM e 5 mM, a glutathione reduzida apresentou efeito



antioxidante durante a criopreservação, sendo a concentração de 7 mM tóxica ao sêmen equino. A centrifugação em gradiente de única camada induziu à lipoperoxidação do sêmen, não sendo observada ação antioxidante da glutathione reduzida durante este procedimento.

Palavras-chave: Androcoll-E; antioxidante; EquiPure; espermatozoide; estresse oxidativo; ROS

## ABSTRACT

BENDER, E.S.C. Reduced glutathione and single layer centrifugation gradient on lipoperoxidation of cryopreserved equine sperm. 2014. 69f. Dissertation - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2014.

The aims of the experiment were to evaluate the antioxidant effect of reduced glutathione added to equine semen before freezing, in the concentration of 3 mM, 5 mM and 7 mM, and submitted to single layer centrifugation gradient, after thawing, on lipid peroxidation, when used two commercial formulations: Androcoll-E<sup>TM</sup> and Equipure<sup>TM</sup>. The ejaculates (n=19) were frozen in egg yolk extender (Botucio<sup>®</sup>). The sperm variables evaluated were: motility, vigor, morphology, viability and acrosome status, mitochondrial activity, lipid peroxidation and rate of sperm recovery after centrifugation. The treatment means were compared by the Kruskal-Wallis test, Bonferroni, Duncan and Student t tests, according to the data behavior, and analyzed the association of lipid peroxidation with the other variables, by the estimated coefficients of Spearman correlation, at the 5% level of significance. The reduced glutathione at 3 mM and 5 mM presented, after thawing, a protective effect against the lipoperoxidation (710.2; 636,3 vs. 565.7 ng / 10<sup>8</sup> sperm; P > 0.05), however, 7 mM concentration was found to be toxic, with lower means (P < 0.05) motility (23 % vs. 60 %) and vigor (1.3 vs. 2.8), and increased lipid peroxidation (704.5 vs. 565.7 ng / 10<sup>8</sup> sperm, P < 0.05) when compared to harvest values. After gradient centrifugation single layer samples had higher levels of lipid peroxidation (P < 0.05), regardless of the gradient used. It is concluded that the concentrations of 3 mM and 5 mM, reduced glutathione showed antioxidant effect during cryopreservation, the concentration of 7 mM seems to be toxic to equine semen. The single layer

centrifugation gradient induced lipid peroxidation of the semen, no antioxidant action of reduced glutathione during this procedure was observed.

Keywords: Androcoll-E; antioxidant; EquiPure; oxidative stress; ROS; sperm

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO DE LITERATURA

|                                            |    |
|--------------------------------------------|----|
| Figura 1. Ciclo redox da glutathiona ..... | 23 |
|--------------------------------------------|----|

### GLUTATHIONA REDUZIDA E CENTRIFUGAÇÃO EM GRADIENTE DE ÚNICA CAMADA NA LIPOPEROXIDAÇÃO DO SÊMEN EQUINO CRIOPRESERVADO

|                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Fluxograma do protocolo experimental para avaliação dos efeitos da adição da glutathiona reduzida (GSH) ao diluente de congelamento e da centrifugação em gradiente de densidade de única camada sobre o nível de lipoperoxidação no sêmen equino ..... | 37 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 2. Proporção média de espermatozoides de acordo com as classes referentes à atividade mitocondrial (A; B; C e D) do sêmen criopreservado de garanhões da raça Quarto de Milha (n=19), considerando a interação entre os tratamentos e os momentos de avaliação, utilizando centrifugação com Androcoll-E® ..... | 50 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 3. Proporção média de espermatozoides de acordo com as classes referentes à atividade mitocondrial (A; B; C e D) do sêmen criopreservado de garanhões da raça Quarto de Milha (n=19), considerando a interação entre os tratamentos e os momentos de avaliação, utilizando centrifugação com EquiPure™ ..... | 51 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 4. Médias ajustadas da variável lipoperoxidação do sêmen criopreservado de garanhões da raça Quarto de Milha (n=19), considerando a interação entre os tratamentos e os momentos de avaliação, de acordo com o gradiente de centrifugação utilizado (A – Androcoll-E®; B - EquiPure™) ..... | 52 |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## LISTA DE TABELAS

### GLUTATIONA REDUZIDA E CENTRIFUGAÇÃO EM GRADIENTE DE ÚNICA CAMADA NA LIPOPEROXIDAÇÃO DO SÊMEN EQUINO CRIOPRESERVADO

- Tabela 1. Médias ( $\pm$  desvio padrão) das variáveis do sêmen criopreservado de garanhões da raça Quarto de Milha (n=19), de acordo com as concentrações de glutathione reduzida adicionadas ao diluidor de congelamento ..... 45
- Tabela 2. Médias ( $\pm$  desvio padrão) das variáveis do sêmen criopreservado de garanhões da raça Quarto de Milha (n=19), nos diferentes momentos de avaliação, utilizando a centrifugação com Androcoll-E<sup>®</sup> ..... 46
- Tabela 3. Médias ( $\pm$  desvio padrão) das variáveis do sêmen criopreservado de garanhões da raça Quarto de Milha (n=19), nos diferentes momentos de avaliação, utilizando a centrifugação com EquiPure<sup>™</sup> ..... 47
- Tabela 4. Médias ajustadas ( $\pm$  desvio padrão) das variáveis motilidade, vigor e viabilidade e *status* acrossomal (*Trypan Blue* / Giemsa - TBG) do sêmen criopreservado de garanhões da raça Quarto de Milha (n=19), considerando a interação entre os tratamentos e os momentos de avaliação, utilizando a centrifugação com Androcoll-E<sup>®</sup> ..... 48
- Tabela 5. Médias ajustadas ( $\pm$  desvio padrão) das variáveis motilidade, vigor e viabilidade e *status* acrossomal (*Trypan Blue* / Giemsa - TBG) do sêmen criopreservado de garanhões da raça Quarto de Milha (n=19), considerando a interação entre os tratamentos e os momentos de avaliação, utilizando a centrifugação com EquiPure<sup>™</sup> ..... 49
- Tabela 6. Médias ajustadas ( $\pm$  desvio padrão) das taxas de recuperação espermática (%) após centrifugação em gradiente de única camada do sêmen criopreservado de garanhões da raça Quarto de Milha (n=19), considerando a interação entre os tratamentos e os gradientes de única camada..... 51

## SUMÁRIO

|                                                                   |           |
|-------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                         | <b>15</b> |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>                              | <b>16</b> |
| <b>2.1 Criopreservação e seus Danos a Célula Espermática.....</b> | <b>16</b> |
| <b>2.2 Espécies Reativas de Oxigênio .....</b>                    | <b>18</b> |
| <b>2.3 Lipoperoxidação .....</b>                                  | <b>20</b> |
| <b>2.4 Antioxidantes .....</b>                                    | <b>21</b> |
| <b>2.5 Glutathione Reduzida .....</b>                             | <b>22</b> |
| <b>2.6 Centrifugação em Gradiente de Única Camada .....</b>       | <b>25</b> |
| <b>3 REFERÊNCIAS .....</b>                                        | <b>27</b> |

## GLUTATHIONE REDUZIDA E CENTRIFUGAÇÃO EM GRADIENTE DE ÚNICA CAMADA NA LIPOPEROXIDAÇÃO DO SÊMEN EQUINO CRIOPRESERVADO

|                                                                            |           |
|----------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>RESUMO .....</b>                                                        | <b>33</b> |
| <b>1 Introdução .....</b>                                                  | <b>34</b> |
| <b>2 Material e Métodos .....</b>                                          | <b>36</b> |
| <b>2.1 Local do Experimento .....</b>                                      | <b>36</b> |
| <b>2.2 Animais .....</b>                                                   | <b>36</b> |
| <b>2.3 Delineamento Experimental .....</b>                                 | <b>37</b> |
| <b>2.4 Colheita e Transporte do Sêmen .....</b>                            | <b>38</b> |
| <b>2.5 Processamento do Sêmen .....</b>                                    | <b>38</b> |
| <i>2.5.1 Congelação e descongelação .....</i>                              | <i>38</i> |
| <i>2.5.2 Centrifugação em gradiente de densidade de única camada .....</i> | <i>39</i> |
| <i>2.5.3 Avaliação seminal .....</i>                                       | <i>39</i> |
| <i>2.5.4 Motilidade e vigor espermáticos .....</i>                         | <i>39</i> |
| <i>2.5.5 Concentração espermática .....</i>                                | <i>40</i> |
| <i>2.5.6 Morfologia espermática .....</i>                                  | <i>40</i> |
| <i>2.5.7 Viabilidade e status acrossomal .....</i>                         | <i>40</i> |
| <i>2.5.8 Atividade mitocondrial .....</i>                                  | <i>41</i> |
| <i>2.5.9 Lipoperoxidação .....</i>                                         | <i>42</i> |
| <b>2.6 Análise Estatística .....</b>                                       | <b>43</b> |
| <b>3 Resultados .....</b>                                                  | <b>44</b> |

|                            |           |
|----------------------------|-----------|
| <b>4 Discussão .....</b>   | <b>52</b> |
| <b>5 Conclusões .....</b>  | <b>62</b> |
| <b>Agradecimento .....</b> | <b>62</b> |
| <b>Referências .....</b>   | <b>62</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

As biotecnologias da reprodução animal têm se mostrado, na atualidade, fundamentais para o progresso genético dos sistemas de produção animal, incluindo-se nesse contexto a reprodução equina, que vem adotando de forma crescente o uso das técnicas de multiplicação animal na rotina dos haras.

A preservação do sêmen equino, pela refrigeração e congelação, vem reduzindo fronteiras, possibilitando que uma égua possa ser inseminada com o sêmen de um garanhão alojado à longa distância. A criopreservação ainda possibilita o armazenamento do sêmen por período indeterminado, podendo assim ser utilizado no caso do garanhão encontrar-se enfermo ou apresentar infertilidade adquirida e até mesmo após seu óbito. No entanto, os espermatozoides sofrem injúrias durante o processo de criopreservação, como os estresses térmico, osmótico e oxidativo, o que resulta em lesões na estrutura física e/ou comprometimento do metabolismo celular (Moran et al., 1992; Cormier et al., 1997; Pommer et al., 2002; Silva et al., 2011; Macías-García et al., 2012).

Durante os procedimentos de manipulação do ejaculado há aumento da concentração de cálcio intracelular, da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e redução da capacidade antioxidante decorrente da remoção do plasma seminal. Tais eventos levam os espermatozoides a um estresse oxidativo exacerbado e à capacitação prematura, tendo como consequência a redução da longevidade do sêmen (Cormier et al., 1997; Neild et al., 2003; Neild et al., 2005).

Essas informações suscitam a realização de pesquisas que busquem estratégias para reduzir estes danos, visando obter uma melhor qualidade seminal, a qual irá se refletir em maior taxa de fertilidade.

Doses de sêmen de garanhões apresentando motilidade pós-descongelação abaixo de 30%, podem ser submetidas à centrifugação em gradiente de única camada, para a seleção de uma maior população de espermatozoides viáveis (Morrell et al., 2009a; Morrell et al., 2010; Stoll et al., 2010; Morrell et al., 2011; Crespo et al., 2013; Stoll et al., 2013).



O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito antioxidante da glutathiona reduzida (GSH), adicionada ao sêmen equino pré-congelação, sobre os níveis de lipoperoxidação pós-descongelação e seleção espermática pela centrifugação em gradientes de única camada.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Criopreservação e seus Danos a Célula Espermática**

Durante o processo de congelação e descongelação a célula espermática sofre injúrias, sendo de grande importância o conhecimento dos mecanismos envolvidos, para que sejam definidos protocolos mais adequados, procurando-se obter maior proporção de células estrutural e funcionalmente íntegras após a descongelação.

Na fase, de resfriamento do sêmen a temperatura é reduzida a 5°C. Nesta fase a célula espermática sofre o primeiro estresse térmico, momento em que, a membrana plasmática que se encontra em estado fluido cristalino, passa para o estado gel, devido ao rearranjo das caudas hidrocarbonadas dos fosfolipídios das cadeias poli-insaturadas, evento denominado de transição de fase (Hammerstedt et al., 1990).

Moran et al. (1992) demonstraram que a faixa de temperatura em que o espermatozoide equino é mais sensível ao choque térmico pelo frio está entre 19°C e 8°C. O resfriamento deve ser feito de forma lenta para reduzir alterações irreversíveis nas características seminais, como rápido declínio da motilidade, presença de movimento circular ou retrógrado, lesões na membrana plasmática e acrossomo, redução do metabolismo e perda de componentes intracelulares. Estas alterações devem-se à velocidade em que ocorre a transição de fase (Graham, 2011a).

Os diluentes de congelação podem apresentar diferentes composições, fato que pode influenciar a taxa de resfriamento a ser utilizada. No sêmen equino taxas de -10°C/min. e -60°C/min. são adotadas com sucesso, dependendo do diluente de criopreservação (Graham, 2011b).

Existem duas classes de crioprotetores, os não penetrantes e os penetrantes. Os não penetrantes incluem os açúcares (lactose, rafinose, sucrose), lipoproteínas

(ovo, leite, soro) e outras macromoléculas (metilcelulose, álcool polivinílico, polivinilpirrolidona). A principal função desses crioprotetores é criar um meio extracelular hiperosmótico que irá induzir a desidratação das células (Graham, 2011b). Dentre os penetrantes, o mais utilizado é o glicerol, além do dimetil sulfóxido, metil formamida e etileno glicol, os quais atuam por substituir a água no meio intracelular, o que reduz o ponto de congelação. Além disso, aumentam os canais de água entre os cristais de gelo extracelular e, com isso, o espaço disponível para a permanência das células, e reduzem a concentração de sais na solução não congelada (Squires et al., 2004; Graham, 2011b).

Durante o processo de criopreservação, com a redução da temperatura ( $-5^{\circ}\text{C}$  –  $-10^{\circ}\text{C}$ ), inicia-se a formação de gelo extracelular, o que resulta em um aumento da hipertonicidade do meio. Este fato leva à perda de água pelas células espermáticas, buscando o equilíbrio osmótico, fazendo com que a mesma se desidrate, o que evita a formação do gelo intracelular. No entanto, a taxa de congelação deve ser lenta o suficiente para evitar a geração de gelo, e rápida o suficiente para evitar a desidratação excessiva da célula (Pommer et al., 2002; Correa et al., 2007; Morris et al., 2007).

O princípio da formação de gelo intracelular é aceito para a criopreservação do sêmen de diferentes espécies; no entanto, Morris et al. (2007) não observaram evidências deste evento após adotarem uma taxa rápida de congelação ( $300$  e  $3.000^{\circ}\text{C} / \text{minuto}$ ) em sêmen equino.

Durante a descongelação, o meio extracelular é hipotônico em relação ao espermatozoide, fazendo com que haja influxo de água na célula, podendo dobrar o seu volume inicial. Para reduzir este efeito, a taxa de descongelação deverá ser diretamente proporcional à taxa de congelação utilizada (Hammerstedt et al., 1990; Graham, 2011b).

O processo de descongelação parece ser mais prejudicial à célula espermática quando comparado ao de congelação. Em um estudo de Pommer et al. (2002), espermatozoides submetidos ao meio hipertônico apresentaram membrana plasmática intacta e preservaram suas mitocôndrias; no entanto, houve redução marcante da preservação dessas características quando os espermatozoides foram submetidos ao meio hipotônico. Embora seja possível à maioria das células retornarem ao seu volume inicial, elas não são capazes de recuperar a motilidade e o potencial de membrana mitocondrial.

Em análise ultraestrutural do espermatozoide equino, Silva et al. (2011) observaram alterações pós-descongelamento, como a fusão entre as membranas acrossomal e plasmática, aumento de volume, ruptura da membrana plasmática da região da cabeça e perda da mesma na peça intermediária, além de desorganização estrutural e vacuolização mitocondrial. As mudanças de osmolaridade são mais deletérias para a membrana mitocondrial que para a membrana plasmática, e podem gerar um estresse oxidativo no espermatozoide equino, pelo aumento da geração de ânion superóxido ( $O_2^-$ ; Burnaugh et al., 2010, Macías-García et al., 2012). Esse estresse oxidativo leva à lipoperoxidação, que pode resultar em redução da motilidade (Ball, 2011), promover a capacitação prematura (Neild et al., 2003), causar a fragmentação do DNA (Baumber et al., 2003), além de induzir à apoptose (Bejarano et al., 2008; Ortega-Ferrusola et al., 2009), levando ao envelhecimento prematuro dos espermatozoides pós-descongelamento.

## **2.2 Espécies Reativas de Oxigênio**

Os espermatozoides, como todas as células, vivem sob as condições aeróbicas. O oxigênio ( $O_2$ ) é necessário para manter a vida, mas os produtos do metabolismo oxidativo podem ser potencialmente tóxicos, devido à formação de ROS, que, por sua vez, podem modificar a função e viabilidade celulares (Baumber et al., 2000). Com isso, estes catabólitos devem ser continuamente inativados para ter-se apenas a concentração necessária para manter uma função fisiológica normal do espermatozoide (Agarwal et al., 2003).

As ROS têm tendência para reação em cadeia; uma molécula carregando um elétron pode reagir com outra e gerar uma molécula contendo um elétron desemparelhado, formando assim os chamados radicais livres (Sies, 1993). Entre as ROS que possuem maior importância estão o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ) (Baumber et al., 2000; Bilodeau et al., 2001; Burnaugh et al., 2007; Burnaugh et al., 2010). O  $H_2O_2$  é uma das exceções dentre as ROS, não sendo um radical livre.

Dois mecanismos parecem estar envolvidos na produção de ROS no sêmen de mamíferos. O primeiro compreende um sistema enzimático na membrana plasmática que utiliza o NADPH como substrato e, o segundo, relativo à perda de elétron na cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria, sendo esta a principal

fonte geradora de ROS (Ball et al., 2001; Koppers et al., 2008; Ortega-Ferrusola et al., 2009; Peña et al., 2011). O  $O_2^-$  parece ser a primeira ROS gerada pelo espermatozoide e, através da redução do  $O_2$  molecular, este reage de forma rápida e espontânea ou é catalisado pela superóxido dismutase (SOD), formando o  $H_2O_2$ , e se este não for quebrado em água pela glutathione peroxidase (GPx) ou catalase, é transformado pela reação de Fenton, catalisada por íons ferro ( $Fe^{2+}$ ) ou cobre ( $Cu^{2+}$ ), em  $OH^-$  (Ball et al., 2001; Burnaugh et al., 2007; Ott et al., 2007; Peña et al., 2011).

O  $O_2^-$  é pouco reativo e não possui a habilidade de atravessar membranas, agindo apenas no local onde é produzido. Já o  $H_2O_2$  é altamente reativo, têm capacidade de atravessar membranas e possui vida longa. A produção deste radical ocasiona diminuição da produção de energia (ATP), resultando na queda da motilidade espermática (Armstrong et al., 1999; Baumber et al., 2000), porém não afeta a viabilidade (Baumber et al., 2000; Bilodeau et al., 2001), além disso, é considerado extremamente deletério, pois participa da formação do  $OH^-$ , este sendo considerado a ROS mais reativa e nociva para os sistemas biológicos (Nordberg e Arnér, 2001).

O  $OH^-$  é capaz de reagir com as biomoléculas, desencadeando a lipoperoxidação através da retirada de um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos poli-insaturados (*polyunsaturated fatty acids* – PUFAs) da membrana plasmática, podendo resultar na ruptura da mesma. Além disso, quando este radical é produzido próximo ao DNA, pode provocar mudanças purínicas e pirimidínicas e, conseqüentemente, a mutação ou inativação do DNA (Ferreira e Matsubara, 1997; Nordberg e Arnér, 2001).

A redução da motilidade espermática pode ocorrer antes mesmo de serem detectados sinais de lipoperoxidação. Baumber et al. (2000) sugerem que a motilidade é afetada pela ação das ROS independente da ocorrência da lipoperoxidação. A via de ação, provavelmente, se deve à alteração na função mitocondrial, sendo um indicador de estresse oxidativo (Baumber et al., 2003).

A geração de ROS é significativamente maior na presença de espermatozoides não viáveis, com danos causados pela criopreservação ou morfológicamente anormais, particularmente as patologias como gota citoplasmática proximal ou anormalidades na peça intermediária (Ball et al., 2001).

Dano à mitocôndria espermática parece ser uma importante alteração que ocorre no espermatozoide durante a criopreservação. Frequentemente apresenta,

após a descongelação, um edema da peça intermediária de moderado a alto, sugerindo que a mitocôndria sofre os efeitos deletérios desse processo. Estas alterações podem desencadear um metabolismo oxidativo anormal, com geração de ROS e indução de apoptose (Ball, 2008). Bejarano et al. (2008) observaram que o aumento da geração de  $H_2O_2$  mitocondrial estimula a ativação das caspases 3 e 9 e a externalização da fosfatidilserina, os quais são típicos sinais do processo de apoptose.

### 2.3 Lipoperoxidação

A produção excessiva de ROS gera o estresse oxidativo, que leva a uma reação na membrana plasmática denominada lipoperoxidação. Os espermatozoides são particularmente susceptíveis por causa da alta concentração de PUFA's presentes na membrana (Baumber et al., 2000).

Os PUFA's são necessários para dar fluidez à membrana plasmática, sendo importantes para a motilidade e viabilidade dos espermatozoides, assim como para a fusão entre membranas durante o processo de fecundação, mas durante a lipoperoxidação há perda de PUFA's (Baumber et al., 2000; Macías-García et al., 2011). Os danos ocorrem principalmente na peça intermediária, sendo menos evidentes na cabeça e cauda do espermatozoide (Ortega-Ferrusola et al., 2009). Este estresse oxidativo é resultado de um desequilíbrio nas concentrações de antioxidantes (agentes redutores) e de radicais livres (agente oxidantes), normalmente ocorrendo quando da produção excessiva de ROS.

As ROS não são suficientes para iniciar a lipoperoxidação, pois, para isto, normalmente é necessário um metal de transição catalisador (principalmente o  $Fe^{2+}$ ; Ball e Vo, 2002). Uma vez iniciada a lipoperoxidação, pode haver alteração na fluidez da membrana plasmática, a qual pode afetar a capacidade de fusão das membranas espermáticas, durante a reação acrossomal (Ball, 2011).

O plasma seminal equino possui em sua composição uma proteína ferro ligante denominada lactoferrina (Inagaki et al., 2002). Esta proteína pode estar relacionada com uma importante função na redução do ferro disponível, reduzindo a lipoperoxidação (Halliwell e Gutteridge, 1986; Ball, 2011).

Após a descongelação foram observadas correlações significativas entre lipoperoxidação e viabilidade espermática ( $r=-0,789$ ;  $P<0,001$ ) e, lipoperoxidação e potencial de membrana mitocondrial ( $r=-0,689$ ,  $P<0,001$ ; Ortega-Ferrusola et al., 2009). Os autores sugerem que a susceptibilidade à lipoperoxidação pode explicar a diferença de crioresistência entre o sêmen de garanhões e, também, entre ejaculados de um mesmo garanhão.

Os produtos citotóxicos da lipoperoxidação, como o radical peroxil, o malondialdeído e 4-hidroxinonenol podem, ainda, provocar peroxidação do DNA, sendo um importante mecanismo na perda da integridade do mesmo (Baumber et al., 2003).

Para mensuração da lipoperoxidação no sêmen vêm sendo utilizadas duas técnicas laboratoriais. Uma delas é a quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que envolve a mensuração da concentração de malondialdeído (Domínguez-Rebolledo et al., 2010), um produto final da lipoperoxidação (Baumber et al., 2000). Uma segunda técnica, BODIPY 581/591 C<sub>11</sub>, utiliza um análogo de ácidos graxos que possui propriedades fluorescentes, mudando da cor vermelha para a verde, frente à oxidação induzida pelos radicais livres. Este teste também permite avaliar as regiões do espermatozoide onde ocorre a lipoperoxidação (Domínguez-Rebolledo et al., 2010).

## **2.4 Antioxidantes**

Para que o estresse oxidativo e, conseqüentemente, a lipoperoxidação não ocorram, as ROS liberadas devem ser constantemente inativadas. Para isto existem os antioxidantes que podem prevenir, interceptar ou reparar a ação dos oxidantes, protegendo a célula e o organismo dos efeitos nocivos da produção excessiva de ROS (Agarwal et al., 2003)

Os antioxidantes, normalmente, são divididos em dois grandes grupos, enzimáticos e não enzimáticos. Entre os enzimáticos são exemplos a catalase, a GPx, a glutathione redutase (GR) e SOD; entre os não-enzimáticos, que são compostos com baixo peso molecular, estão as vitaminas C e E, GSH, ubiquinonas, taurina, hipotaurina, ácido úrico, ácido alfa-lipoico, entre outros (Ferreira e Matsubara, 1997; Norberg e Arnér, 2001).

O reduzido citoplasma do espermatozoide compromete a ação antioxidante intracelular, pela menor quantidade destes agentes no citoplasma comparado a outras células do organismo, e isto resulta em uma maior vulnerabilidade da célula espermática à ação das ROS. Esta característica é compensada pelo plasma seminal que é rico em antioxidantes. No entanto, durante o processo de congelamento grande parte deste plasma é removida, fazendo com que o sêmen congelado torne-se mais sensível ao estresse oxidativo, quando comparado ao sêmen refrigerado (Gadea et al., 2004; Kankofer et al., 2005; Neild et al., 2005).

A centrifugação convencional, utilizada para a retirada do plasma seminal equino, também causa danos mecânicos à membrana plasmática, o que pode induzir a produção de ROS e causar lipoperoxidação, sendo o tempo de centrifugação mais crítico que a força centrífuga utilizada (Shekarriz et al., 1995).

A célula espermática, ao contrário do plasma seminal, possui pequena quantidade de antioxidantes, dentre estes a GSH (L-y-glutamil-L-cisteinilglicina) é a mais importante, sendo um tripeptídeo, encontrado em todas as células, desempenhando uma importante função de defesa intracelular contra o estresse oxidativo (Meister, 1994; Ferreira e Matsubara, 1997).

## **2.5 Glutathione Reduzida**

A GSH é o tiol mais abundante no meio intracelular e sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento sulfidril (-SH), presente na cisteína. Pode atuar como transportadora e reservatório de cisteína e participar da detoxicação de agentes químicos e da eliminação de produtos da lipoperoxidação. A principal função da GSH é servir como um cofator para a GPx, que catalisa a redução de  $H_2O_2$  e hidroperóxidos tóxicos. A forma oxidada da glutathione (GSSG) é regenerada *in vivo* pela GR e NADPH (Meister, 1994; Ferreira e Matsubara et al., 1997; Bilodeau et al., 2001) (Figura 1).

O processo de congelamento está associado com a redução de grande parte da GSH citoplasmática (Bilodeau et al., 2000; Gadea et al., 2004; Gadea et al., 2007), chegando a 80% em bovinos (Bilodeau et al., 2000), razão esta para que o sêmen congelado esteja mais susceptível ao estresse oxidativo.

Estudos vêm sendo desenvolvidos com a adição de antioxidantes no diluidor de congelamento, inclusive a GSH, tentando buscar o equilíbrio entre as ROS e

agentes redutores (Sinha et al., 1996; Câmara et al., 2011; Silva et al., 2011). Estes estudos tornam-se ainda mais importantes frente aos protocolos em que se faz a retirada do plasma seminal durante o processo de criopreservação, quando é removida grande parte dos antioxidantes seminais, como no caso do sêmen equino e suíno (Baumber et al., 2005; Gadea et al., 2005a).

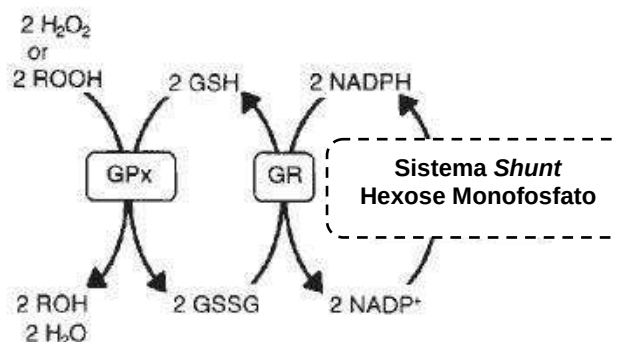


Figura 1. Ciclo redox da glutatona (Adaptado de Bilodeau et al., 2001)

Baumber et al. (2003) encontraram efeito protetor da adição de GSH (10 mM) sobre a integridade do DNA de espermatozoide equino exposto a um sistema de geração de ROS (xantina-xantina oxidase), avaliado por meio do ensaio Cometa.

Quando a GSH foi adicionada ao meio diluidor para refrigeração, não foi observado efeito significativo sobre a qualidade seminal (suíno – Gadea et al., 2005a; ovino - Bucak e Tekin, 2007; Câmara et al., 2011), diferindo do que vem sendo observado quando o sêmen é submetido à congelação (Sinha et al., 1996; Gadea et al., 2005a; Silva et al., 2011).

Sinha et al. (1996) adicionaram GSH (2 e 5 mM) ao diluente de congelação de sêmen caprino e observaram maior motilidade progressiva e integridade do acrossoma quando o antioxidante foi utilizado na concentração de 5 mM.

Gadea et al. (2005a), congelando sêmen suíno, observaram melhor motilidade espermática e dos parâmetros relacionados à velocidade, maior proporção de espermatozoides viáveis e não capacitados, e menor proporção de células com mudanças nos grupos sulfidríla na membrana lipoproteica após descongelação, quando ao diluente foi adicionada GSH pré-congelação. Este efeito protetor da GSH mostrou ser dose-dependente, sendo significativamente maior quando foi utilizado 1 mM, comparado com 5 mM.



Frente às informações apresentadas, espera-se um efeito antioxidante com a adição de GSH exógena quando há produção exacerbada de ROS ou quando os níveis endógenos estão reduzidos, como ocorre durante a criopreservação de espermatozoides.

Em contraste, Baumber et al. (2005) testaram a adição de GSH (10 mM) no diluente de criopreservação do sêmen equino, não observando diferença significativa quando comparado ao controle.

Da mesma forma, Câmara et al. (2011) não obtiveram efeito antioxidante significativo quando a GSH (0,5, 1,0 e 2,0 mM) foi adicionada ao diluente para congelamento de sêmen ovino. Os autores levantaram a hipótese de que o diluente TRIS, formulado com gema de ovo *in natura*, teria tido uma significativa capacidade antioxidante, devido às lipoproteínas da gema do ovo, as quais são capazes de prevenir a oxidação dos PUFA's (Sakanaka et al., 2004).

Por outro lado, Silva et al. (2011) criopreservando sêmen ovino em meio TRIS suplementado com GSH, observaram efeito protetor, mas empregando concentrações mais elevadas, de 2 e 5 mM. As amostras apresentaram maior proporção de células com acrossoma íntegro ( $P < 0,05$ ), sendo esta característica semelhante com a proporção obtida à avaliação do sêmen fresco. Também foi testada a concentração de 7 mM, contudo, ao invés do efeito protetor, esta levou a menores valores de integridade acrossomal e mitocondrial ( $P < 0,05$ ), com consequente redução da motilidade total ( $P < 0,05$ ), demonstrando assim que o efeito da GSH parece ser dose-dependente.

Algumas pesquisas relatam um efeito protetor significativo da GSH quando esta é adicionada ao sêmen pós-descongelamento. De fato, os resultados obtidos indicaram menor número de espermatozoides com capacitação espermática prematura, preservação da condensação da cromatina, alta taxa de penetração de ovócito (*in vitro*), além da redução das concentrações de ROS (suíno – Gadea et al., 2005b; bovino – Gadea et al., 2007).

Como se pode constatar, o ajuste da concentração ideal de GSH, nas diferentes espécies, é um fator importantíssimo, pois na dependência das doses utilizadas, as mesmas podem não apresentar efeito ou mesmo serem tóxicas, ou, mostrarem-se efetivamente protetoras para as células, sendo esta a ação antioxidante desejada. O efeito antioxidante da GSH exógena sobre o sêmen criopreservado ainda está pouco elucidado, e são escassos os relatos para a

espécie equina. Portanto, ainda são necessários maiores estudos para determinar qual a concentração ideal a ser acrescida no diluente de criopreservação do sêmen equino.

## 2.6 Centrifugação em Gradiente de Única Camada

Atualmente, tem sido estudada uma substância coloidal composta de sílica revestida por glicidoxipropiltrimetoxissilano (silano), como gradiente de densidade para centrifugação do sêmen equino, tendo como exemplos as formulações do Androcoll-E® (*Minitub, Tiefenbach, Germany*) e EquiPure™ (*Nidacon, International AB, Molndal, Sweden*).

A centrifugação do sêmen nestes gradientes tem resultado em uma maior proporção de espermatozoides morfolologicamente normais, com integridade das membranas plasmática e acrossomais e da cromatina, com alto potencial de membrana mitocondrial, associadas a uma maior motilidade espermática (Morrell et al., 2009a; Morrell et al., 2010; Stoll et al., 2010; Morrell et al., 2011; Crespo et al., 2013; Stoll et al., 2013), inclusive quando comparado ao sêmen fresco não centrifugado. O mecanismo de seleção dá-se pela diferença de densidade entre células íntegras e lesadas (Morrell et al., 2010).

A princípio a técnica de seleção espermática empregava gradiente de densidade descontínuo. Macpherson et al. (2002), utilizando o EquiPure™ (40:80%), encontraram maior proporção de espermatozoides morfolologicamente normais no *pellet* do que na fração coloidal. Os gametas com defeitos espermáticos dos tipos cabeça isolada, contorno anormal da cabeça, gota citoplasmática proximal, defeitos da peça intermediária, células imaturas, cauda dobrada e cauda enrolada, ficaram retidos na porção coloide. Posteriormente, constatou-se que o gradiente descontínuo não diferia significativamente daquele de única camada mais concentrada, com a vantagem deste ser de mais rápida e fácil execução (Morrell et al., 2009b - Androcoll-E®; Gutiérrez-Cepeda et al., 2011 - EquiPure™).

A taxa de recuperação de espermatozoides depende da qualidade do ejaculado submetido à centrifugação (Morrell et al., 2009c). Morrell et al. (2011), utilizando a formulação comercial Androcoll-E®, verificaram correlação significativa entre a taxa de recuperação espermática e morfologia normal ( $r=0,64$ ), bem como com a taxa de fragmentação do DNA ( $r=-0,54$ ), no entanto, a correlação com

motilidade progressiva, embora de média intensidade ( $r=0,42$ ), não mostrou-se significativa. Comparando o uso da centrifugação em gradiente de única camada nos momentos pré-congelação e pós-descongelação do sêmen, foi obtida uma população espermática com valores superiores de motilidade, de espermatozoides normais e com acrossooma íntegro, quando a técnica foi aplicada ao sêmen pós-descongelação (Mancill et al., 2010). Esse fato deveu-se à remoção dos espermatozoides que já estavam lesados antes da congelação, bem como daqueles que sofreram lesão durante o processo de criopreservação. Ortega-Ferrusola et al. (2011) acreditam que a centrifugação no Androcoll-E<sup>®</sup> pode reduzir a indução ao estresse oxidativo, pois a centrifugação em única camada remove espermatozoides com excesso de citoplasma residual (Johannisson et al., 2009), assim, reduzindo grande parte da fonte produtora de ROS.

Macías-García et al. (2012) avaliaram a produção de ROS após submeterem sêmen equino refrigerado (5°C), armazenado por 24 horas, à centrifugação em gradiente de única camada utilizando o Androcoll-E<sup>®</sup>, e observaram que a proporção de espermatozoides vivos produzindo  $O_2^-$  foi maior após a centrifugação. Tal fato pode ter sido causado pela remoção do plasma seminal ou pela seleção de uma subpopulação de espermatozoides vivos com maior atividade metabólica que seriam mais capazes de produzir níveis fisiológicos de ROS. Este aumento de  $O_2^-$  endógeno não apresentou efeitos deletérios, não sendo observada diferença ( $P>0,05$ ), quando comparado ao controle, em relação à integridade da membrana plasmática e atividade mitocondrial.

Os efeitos da seleção espermática, pela centrifugação em gradiente de única camada, sobre a lipoperoxidação do sêmen de garanhões, ainda precisam ser avaliados, quando se empregam as formulações comerciais Androcoll-E<sup>®</sup> e EquiPure<sup>™</sup>.

Cerny et al. (2012) testaram a fertilidade do sêmen centrifugado em EquiPure<sup>™</sup>. O número de espermatozoides com motilidade progressiva na dose inseminante do grupo controle foi maior ( $171 \times 10^6$  vs.  $59 \times 10^6$ ;  $P<0,05$ ), mas a proporção de células móveis foi superior nas amostras submetidas à centrifugação (41,6% vs. 67,7%;  $P<0,05$ ), no entanto, as taxas de prenhez não diferiram (60%).

### 3 REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; SALEH, R.A.; BEDAIWY, M.A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility*, v.79, p.829-843, 2003.

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.869-880, 1999.

BALL, B.A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science*, v.107, p.257-267, 2008.

BALL, B.A. Oxidative stress in sperm. In: McKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. *Equine Reproduction*. 2. ed. USA: Blackwell Publishing Ltd, 2011. v.1, cap.98, p.991-995.

BALL, B.A.; VO, A. Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C<sub>11</sub>-BODIPY<sup>581/591</sup>. *Journal of Andrology*, v.23, p.259-269, 2002.

BALL, B.A.; VO, A.T.; BAUMBER, J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *American Journal of Veterinary Research*, v.62, p.518-515, 2001.

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; MEDINA, V.; DAVIES-MOREL, M.C.G. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *Journal of Andrology*, v.21, n.6, p.895-902, 2000.

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.

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers antioxidants. *American Journal of Veterinary Research*, v.66, p.772-229, 2005.

BEJARANO, I.; LOZANO, G.M.; ORTIZ, A.; GARCÍA, J.F.; PAREDES, S.D.; RODRÍGUEZ, A.B.; PARIENTE, J.A. Caspase 3 activation in human spermatozoa in response to hydrogen peroxide and progesterone. *Fertility and Sterility*, v.90, p.1340-1347, 2008.

BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; GAGNON, C.; SIRARD, M.A. Thiols prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology*, v.56, p.275-286, 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.

BUCAK, M.N.; TEKIN, N. Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Ruminant Research*, v.73, p.103-108, 2007.

BURNAUGH, L.; BALL, B.A.; SABEUR, K.; THOMAS, A.D.; MEYERS, S.A. Osmotic stress stimulates generation of superoxide anion by spermatozoa in horses. *Animal Reproduction Science*, v.117, p.249-260, 2010.

BURNAUGH, L.; SABEUR, K.; BALL, B.A. Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium. *Theriogenology*, v.67, p.580-589, 2007.

CÂMARA, D.R.; SILVA, S.V.; ALMEIDA, F.C.; NUNES, J.F.; GUERRA, M.M.P. Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen thawed ram semen. *Theriogenology*, v.76, p.342-350, 2011.

CERNY, K.L.; HUGHES, S.; CAMPOS, J.R.; COLEMAN, R.J.; TROEDSSON, M.H.T.; SQUIRES, E.L. Fertility of mares inseminated with frozen-thawed semen processed by single layer centrifugation through a colloid. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.32, p.289-291, 2012.

CORREA, L.M.; THOMAS, A.; MEYERS, S.A. The macaque sperm actin cytoskeleton reorganizes in response to osmotic stress and contributes to morphological defects and decreased motility. *Biology of Reproduction*, v.77, p.942-953, 2007.

CORMIER, N.; SIRARD, M.; BAILEY, J.L. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *Journal of Andrology*, v.18, p.461-468, 1997.

CRESPO, F.; GOSALVEZ, J.; GUTIÉRREZ-CEPEDA, L.; SERRES, C.; JOHNSTON, S.D. Colloidal centrifugation of stallion semen results in a reduced rate of sperm DNA fragmentation. *Reproduction in Domestic Animals*, v.48, p.e23-e25, 2013.

DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, Á.E.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; DEL OLMO, E.; BISBAL, A.; ROS-SANTAELLA, J.L. Comparison of TBARS assay and BODIPY C11 probes for assessing lipid peroxidation in red deer spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, v.45, p.360-368, 2010.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v.43, p.61-68, 1997.

GADEA, J.; GARCÍA-VASQUEZ, F.; MATÁS, 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, 2005a.

GADEA, J.; GUMBAO, D.; MATÁS, C.; ROMAR, R. Supplementation of the thawing media with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of boar spermatozoa after cryopreservation. *Journal of Andrology*, v.26, p.749-756, 2005b.

GADEA, J.; GUMBAO, D.; CÁNOVAS, S.; GARCÍA-VÁSQUEZ, F.A.; GRULLÓN, L.A.; GARDÓN, J.C. Supplementation of the dilution medium after thawing with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of frozen-thawed bull spermatozoa. *International Journal of Andrology*, v.31, p.40-49, 2007.

GADEA, J.; SELLÉS, E.; MARCO, M.A.; COY, P.; MATÁS, 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.

GRAHAM, J.K. Principles of cooled semen. In: McKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. *Equine Reproduction*. 2. ed. USA: Blackwell Publishing Ltd, 2011a. v.1, cap.127, p.1308-1315.

GRAHAM, J.K. Principles of cryopreservation. In: McKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. (Ed.) *Equine Reproduction*. 2. ed. USA: Blackwell Publishing Ltd, 2011b. v.2, cap.314, p.2959-2964.

GUTIÉRREZ-CEPEDA, L.; FERNÁNDEZ, A.; CRESPO, F.; GOSÁLVEZ, J.; SERRES, C. Simple and economic colloidal centrifugation protocols may be incorporated into the clinical equine sperm processing procedure. *Animal Reproduction Science*, v.124, 85-89, 2011.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.246, p.501-514, 1986.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology*, v.11, p.73-88, 1990.

INAGAKI, M.; KIKUCHI, M.; ORINO, K.; OHNAMI, Y.; WATANABE, K. Purification and quantification of lactoferrin in equine seminal plasma. *Journal of Veterinary Medical Science*, v.64, p.75-77, 2002.

JOHANNISSON, A.; MORRELL, J.M.; THORÉN, J.; JOSSON, M.; DALIN, AM.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Colloidal centrifugation with Androcoll-ETM prolongs stallion sperm motility, viability and chromatin integrity. *Animal Reproduction Science*, v.116, p.119-128, 2009.

KANKOFER, M.; KOLM, G.; AURICH, J.; AURICH, C. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5 °C. *Theriogenology*, v.63, p.1354-1365, 2005.

KOPPERS, A.J.; DE IULIIS, G.N.; FINNIE, J.M.; McLAUGHLIN, E.A.; AITKEN, J. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.93, p.3199-3207, 2008.

MACÍAS-GARCÍA, B.; GONZÁLVEZ-FERNÁNDEZ, L.; GALLARDO-BOLAÑOS, J.M.; PEÑA, F.J.; JOHANNISSON, A.; MORRELL, J.M. Androcoll-E large selects a subset of live stallion spermatozoa capable of producing ROS. *Animal Reproduction Science*, v.132, p.74-82, 2012.

MACÍAS GARCÍA, B.; GONZÁLVEZ FERNÁNDEZ, L.; ORTEGA FERRUSOLA, C.; SALAZAR-SANDOVAL, C.; MORILLO RODRÍGUEZ, A.; RODRÍGUEZ MARTINEZ, H.; TAPIA, J.A.; MORCUENDE, D.; PEÑA, F.J. Membrane lipids of the stallion spermatozoon in relation to sperm quality and susceptibility to lipid peroxidation. *Reproduction in Domestic Animals*, v.46, p.141-148, 2011.

MACPHERSON, M.L.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.C.; BRINSKO, S.P.; VARNER, D.D. Use of a silane-coated silica particle solution to enhance the quality of ejaculated semen in stallions. *Theriogenology*, v.58, p.317-320, 2002.

MANCILL, S.S.; LOVE, C.C.; BRINSKO, S.P.; EDMOND, A.J.; FOSTER, M.L.; TEAGUE, S.R.; WAITE, J.A.; VARNER, D.D. Effect of density gradient centrifugation on cryopreservation of equine spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v.121S, p.S208-S209, 2010.

MEISTER, A. Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer Research*, v.54, p.1969-1975, 1994.

MORAN, D.M.; JASKO, D.J.; SQUIRES, E.L.; AMANN, R.P. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.38, p.999-1012, 1992.

MORRELL, J.M.; JOHANNISSON, A.; DALIN, A-M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Single-layer centrifugation with Androcoll-E can be scaled up to allow large volumes of stallion ejaculate to be processed easily. *Theriogenology*, v.72, p.879-884, 2009a.

MORRELL, J.M.; JOHANNISSON, A.; DALIN, A-M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Morphology and chromatin integrity of stallion spermatozoa prepared by density gradient and single layer centrifugation through silica colloids. *Reproduction in Domestic Animals*, v.44, p.512-517, 2009b.

MORRELL, J.M.; JOHANNISSON, A.; STRUTS, H.; DALIN, A-M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Colloidal centrifugation of stallion semen: changes in sperm motility velocity, and chromatin integrity during storage. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.29, p.24-32, 2009c.

MORRELL, J.M.; MACIAS-GARCIA, B.; PENA, F.J.; JOHANNISSON, A. Processing stored stallion doses by single layer centrifugation. *Theriogenology*, v.76, p.1424-1432, 2011.

MORREL, J.M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; JOHANNISSON, A. A single layer centrifugation of stallion spermatozoa consistently selects the most robust spermatozoa from the rest of the ejaculate in a large sample size. *Equine Veterinary Journal*, v.42, p.579-585, 2010.

MORRIS, G.J.; FASZER, K.; GREEN, J.E.; DRAPER, D.; GROUT, B.W.W., FONSECA, F. Rapidly cooled horse spermatozoa: loss of viability is due to osmotic imbalance during thawing, not intracellular ice formation. *Theriogenology*, v.68, p.804-812, 2007.

NEILD, D.M.; BROUWERS, J.F.H.M.; COLENBRANDER, B.; AGUERO, A.; GADELLA, B.M. Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, v.72, p.230-238, 2005.

NEILD, D.M.; GADELLA, B.M.; CHAVES, M.G.; MIRAGAYA, M.H., COLEMBRANDER, B.; AGUERO, A. Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology*, v.59, p.1693-1705, 2003.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine*, v.31, n.1, p.1287-1312, 2001.

ORTEGA FERRUSOLA, C.; GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, L.; MORRELL, J.M.; SALAZAR SANDOVAL, C.; MACÍAS GARCÍA, B.; RODRÍGUEZ-MARTINEZ, H.; TAPIA, J.A.; PEÑA, F.J. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C<sub>11</sub>, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. *Reproduction*, v.138, p.55-63, 2009.

ORTEGA-FERRUSOLA, C.; JOHANNISSON, A.; VEGA, F.J.P.; TAPIA, J.A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; DALIN, A.M.; MORRELL, J.M. Effect of different extenders and seminal plasma on the susceptibility of equine spermatozoa to lipid peroxidation after single-layer centrifugation, through Androcoll-E. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.31, p.411-416, 2011.

OTT, M.; GOGVADZE, V.; ORRENIUS, S.; ZHIVOTOVSKY, B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis*, v.12, p.913-922, 2007.

PEÑA, F.J.; MACÍAS-GARCÍA, B.; SAMPER, J.C.; APARICIO, I.M.; TAPIA, J.A.; ORTEGA FERRUSOLA, C. Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: the way to improve current cryopreservation protocols? *Theriogenology*, v.76; p.1177-1186, 2011.

POMMER, A.C.; RUTLLANT, J.; MEYERS, S.A. The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function. *Theriogenology*, v.58; p.1373-1384, 2002.

SAKANAKA, S.; TACHIBANA, Y.; ISHIHARA, N.; JUNEJA, L.R. Antioxidant activity of egg-yolk protein hydrolysates in linoleic acid oxidation system. *Food Chemistry*, v.86, p.99-103, 2004.



SHEKARRIZ, M.; DE-WIRE, D.M.; THOMAS-JR, A.J.; AGARWAL, A. A method of human semen centrifugation to minimize the iatrogenic sperm injuries caused by reactive oxygen species. *European Urology*, v.28, p.31-35, 1995.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*, v.215, p.213-219, 1993.

SILVA, S.V.; SOARES, A.T.; BATISTA, A.M.; ALMEIDA, F.C.; NUNES, J.F.; PEIXOTO, C.A.; GUERRA, M.M.P. *In vitro* and *in vivo* evaluation of ram sperm frozen in tris egg-yolk and supplemented with superoxide dismutase and reduced glutathione. *Reproduction in Domestic Animals*, v.46, p.874-881, 2011.

SINHA, M.P.; SINHA, A.K.; SINGH, B.K.; PRASAD, R.L. The effect of glutathione on the motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. *Animal Reproduction Science*, v.41, p.237-243, 1996.

SQUIRES, E.L.; KEITH, S.L.; GRAHAM, J.K. Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.62, p.1056-1065, 2004.

STOLL, A.; LOVE, C.C.; BALL, B.A. Use of a single layer density centrifugation to reduce the number of DNA-damage sperm and enhance sperm quality in cryopreserved-thawed stallion semen. *Animal Reproduction Science*, v.121S, p.S163-S164, 2010.

STOLL, A.; LOVE, C.C.; BALL, B.A. Use of a single-layer density centrifugation method enhances sperm quality in cryopreserved-thawed equine spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.33, p.547-551, 2013.

## GLUTATIONA REDUZIDA E CENTRIFUGAÇÃO EM GRADIENTE DE ÚNICA CAMADA NA LIPOPEROXIDAÇÃO DO SÊMEN EQUINO CRIOPRESERVADO

E.S.C. Bender<sup>a</sup>, M. Nichi<sup>b</sup>, C.E.S.N. Zúccari<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup>Mestranda do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Mato Grosso do Sul, Brasil. E-mail: erikabender.vet@gmail.com

<sup>b</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil. E-mail: mnichi@usp.br

<sup>a</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FAMEZ) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Mato Grosso do Sul, Brasil. E-mail: carmem.zuccari@ufms.br

\*Autor correspondente: Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal, FAMEZ, UFMS – Caixa Postal 549, Cep: 79.070-900 – Campo Grande, MS – Brasil. E-mail: carmem.zuccari@ufms.br (C.E.S.N. Zúccari).

### RESUMO

Os objetivos do experimento foram avaliar o efeito antioxidante da glutatona reduzida adicionada ao sêmen equino pré-congelação, nas concentrações de 3 mM, 5 mM e 7 mM, e da centrifugação em gradiente de única camada, após a descongelação, utilizando as formulações comerciais Androcoll-E<sup>®</sup> e Equipure<sup>™</sup>, sobre os níveis de lipoperoxidação. Os ejaculados (n=19) foram congelados em diluente a base de gema de ovo (Botucrio<sup>®</sup>). Foram avaliadas as variáveis espermáticas: motilidade, vigor, morfologia, viabilidade/*status* acrossomal, atividade

mitocondrial, nível de lipoperoxidação e taxa de recuperação espermática pós-centrifugação. As médias dos tratamentos foram comparadas pelos testes de *Kruskall-Wallis*, *Bonferroni*, *Duncan* e *t de Student*, de acordo com o comportamento dos dados, e analisada a associação da lipoperoxidação com as demais variáveis, pela estimativa dos coeficientes de correlação de *Spearman*, em nível de 5% de significância. Quando comparados aos valores pós-colheita, a glutathione reduzida nas concentrações de 3 mM e 5 mM apresentou, após a descongelação, um efeito protetor contra a lipoperoxidação (710,2; 636,3 vs. 565,7 ng/10<sup>8</sup> espermatozoides; P>0,05), no entanto, a concentração de 7 mM mostrou-se tóxica, com menores médias (P<0,05) de motilidade (23% vs. 60%), vigor (1,3 vs. 2,8) e aumento da lipoperoxidação (704,5 vs. 565,7 ng/10<sup>8</sup> espermatozoides; P<0,05). Após a centrifugação em gradiente de única camada, as amostras apresentaram maiores níveis de lipoperoxidação (P<0,05), independente do gradiente utilizado. Conclui-se que, nas concentrações de 3 mM e 5 mM, a glutathione reduzida apresentou efeito antioxidante durante a criopreservação, sendo a concentração de 7 mM tóxica ao sêmen equino. A centrifugação em gradiente de única camada induziu à lipoperoxidação do sêmen, não sendo observada ação antioxidante da glutathione reduzida durante este procedimento.

**Palavras-chave:** Androcoll-E, antioxidante, EquiPure, espermatozoide, estresse oxidativo, ROS

## 1 Introdução

As biotecnologias da reprodução animal têm se mostrado, na atualidade, fundamentais para o progresso genético dos sistemas de produção animal,

incluindo-se nesse contexto a reprodução equina, que vem adotando de forma crescente o uso das biotécnicas de multiplicação animal na rotina dos haras.

A preservação do sêmen equino, pela refrigeração e congelação, vem reduzindo fronteiras, possibilitando que uma égua possa ser inseminada com o sêmen de um garanhão alojado à longa distância. A criopreservação ainda possibilita o armazenamento do sêmen por período indeterminado, podendo assim ser utilizado no caso do garanhão encontrar-se enfermo ou apresentar infertilidade adquirida e até mesmo após seu óbito.

No que se refere à criopreservação, durante os procedimentos de manipulação do ejaculado há aumento da concentração de cálcio intracelular, da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e redução da capacidade antioxidante decorrente da remoção do plasma seminal. Tais eventos levam os espermatozoides a um estresse oxidativo exacerbado e, com isso, à capacitação prematura, tendo como consequência uma redução da sua longevidade (Ball et al., 2001; Neild et al., 2005, 2003).

Essas informações suscitam a realização de pesquisas que busquem estratégias para reduzir estes danos, visando obter melhor qualidade seminal, a qual irá se refletir em maior taxa de fertilidade.

O plasma seminal é rico em antioxidantes, sendo exemplos a catalase, glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), superóxido dismutase (SOD), glutathione reduzida (GSH), urato, ácido ascórbico, vitamina E, taurina, hipotaurina, piruvato, carotenoides e ubiquinonas (Gadea et al., 2004; Kankofer et al., 2005; Neild et al., 2005). A célula espermática, ao contrário do plasma seminal, possui pequena quantidade de antioxidantes, e dentre estes a GSH (L-y-glutamyl-L-cisteinilglycine) é a mais importante, sendo um tripeptídeo, encontrado em todas as

células (Meister, 1994). O efeito antioxidante da GSH exógena sobre o sêmen criopreservado ainda está pouco elucidado, e são escassos os relatos para a espécie equina. Ainda não está definida qual a concentração ideal a ser acrescida no diluente de criopreservação do sêmen equino.

Doses de sêmen de garanhões apresentando motilidade pós-descongelação abaixo de 30%, podem ser submetidas à centrifugação em gradiente de única camada, para a seleção de uma maior população de espermatozoides viáveis (Morrell et al., 2009a; Morrell et al., 2010; Stoll et al., 2010; Morrell et al., 2011; Crespo et al., 2013; Stoll et al., 2013).

Os efeitos da seleção espermática, pela centrifugação em gradiente de única camada, sobre a lipoperoxidação do sêmen de garanhões, ainda precisam ser avaliados, em especial quando se empregam as formulações comerciais Androcoll-E® e Equipure™.

O objetivo do presente experimento foi avaliar o efeito antioxidante da GSH, adicionada ao sêmen equino pré-congelação, sobre os níveis de lipoperoxidação pós-descongelação e seleção espermática pela centrifugação em gradientes de única camada.

## **2 Material e Métodos**

### **2.1 Local do Experimento**

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (FAMEZ/UFMS), Campo Grande/MS, Brasil.

### **2.2 Animais**

Foram utilizados 10 garanhões adultos da raça Quarto de Milha, de fertilidade comprovada, alojados em propriedades localizadas nas proximidades de Campo Grande/MS, Brasil, sendo colhidos dois ejaculados de cada reprodutor. Foram adotados como critérios para utilização dos ejaculados, um mínimo de 70% para motilidade, 3 para o vigor e 70% de espermatozoides com morfologia normal pós-colheita.

### 2.3 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi um fatorial 4 x 2 (glutathiona x gradiente de única camada). Foram testadas três concentrações de glutathiona reduzida, e dois gradientes de única camada (Fig. 1).

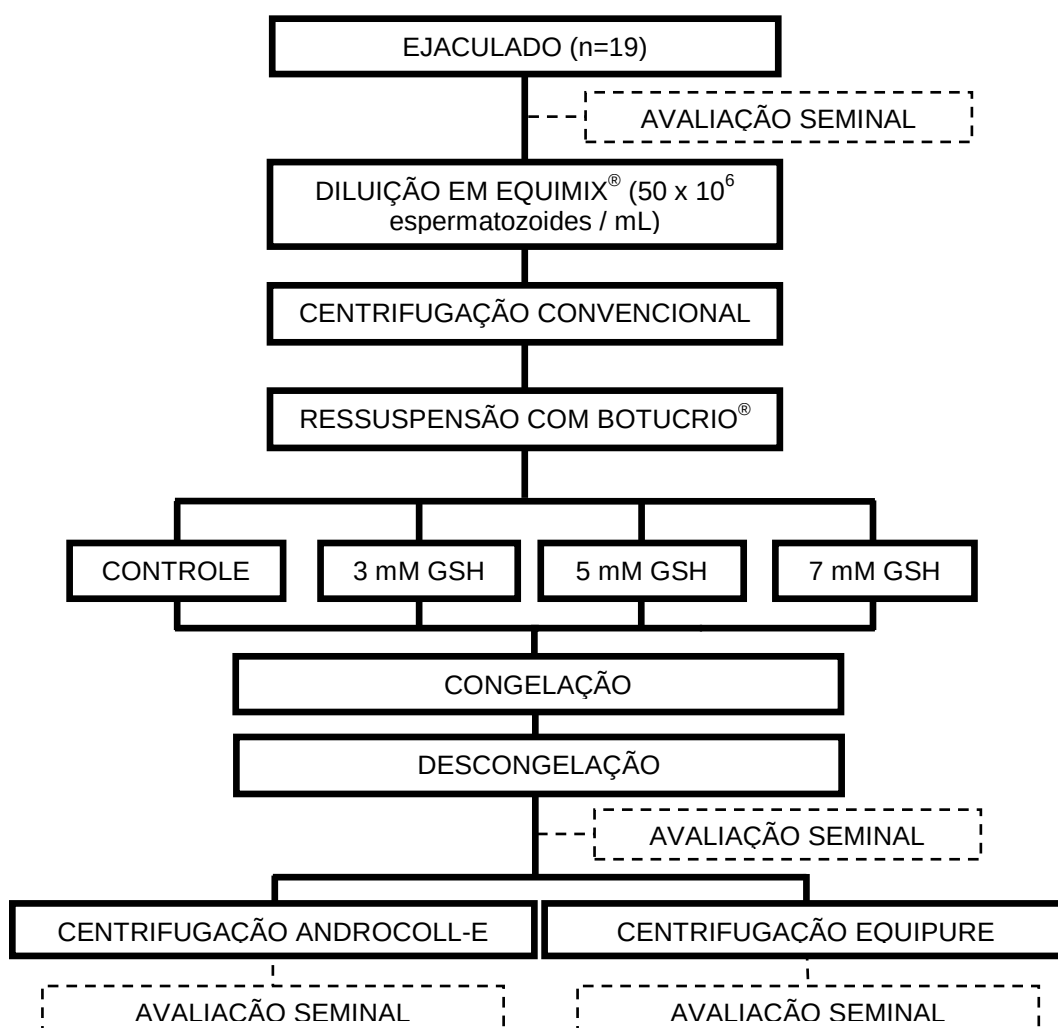


Figura 1. Fluxograma do protocolo experimental para avaliação dos efeitos da adição da glutathiona reduzida (GSH) ao diluente de congelamento e da centrifugação em gradiente de densidade de única camada sobre o nível de lipoperoxidação no sêmen equino

## 2.4 Colheita e transporte do sêmen

O sêmen foi colhido com auxílio de manequim, através de vagina artificial modelo Botucatu<sup>®</sup> (Botupharma Biotecnologia Animal, Botucatu/SP, Brasil), revestida internamente com mucosas de látex e plástica descartável, sendo esta acoplada a um copo coletor, e equilibrada para que, no momento da colheita, sua temperatura interna se apresentasse a aproximadamente 45°C. Após a colheita o sêmen foi filtrado, para separação da fração gel, e diluído em meio à base de leite desnatado para obtenção de uma concentração de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Para o transporte até o laboratório, o material foi acondicionado em *container* (CP; Nunes et al., 2008) a uma temperatura de 5°C.

## 2.5 Processamento do sêmen

### 2.5.1 Congelação e descongelação

O sêmen diluído foi submetido à centrifugação em tubos cônicos de 15 mL a 600 G por 10 minutos. O *pellet* foi ressuspendido em Botucrio<sup>®</sup> (Botupharma Biotecnologia Animal Botucatu/SP, Brasil), para a obtenção de uma concentração final de  $200 \times 10^6$  espermatozoides/mL. O volume final foi fracionado em quatro alíquotas contendo  $500 \times 10^6$  espermatozoides, às quais foi acrescida a glutatona reduzida, sendo constituídos os seguintes tratamentos: **C** – controle, sem glutatona; **GSH 3** – 3 mM de GSH; **GSH 5** – 5 mM de GSH e **GSH 7** – 7 mM de GSH. O sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL, lacradas com álcool polivinílico. O processo de congelação foi realizado adotando-se um período de 20 minutos de refrigeração a 5°C, seguidos por 20 minutos de exposição ao vapor de nitrogênio líquido e subsequente imersão no mesmo. Após este procedimento, as palhetas foram acondicionadas em raques e armazenadas em botijão criogênico a -196°C. À descongelação utilizou-se banho-maria a 37°C por 30 segundos.

### 2.5.2 Centrifugação em gradiente de densidade de única camada

Após a descongelação amostras de cada tratamento foram submetidas à centrifugação com rotor de eixo móvel (Centrífuga de Bancada Baby<sup>®</sup> - FANEM LTDA., Guarulhos/SP, Brasil) em dois gradientes de densidade: **ADC** – Androcoll<sup>®</sup> Equine (Androcoll-E; Minutüb GmbH, Tiefenbach, Germany); **EQP** – EquiPure<sup>™</sup> (Nidacon, International AB, Molndal, Sweden). A centrifugação com ADC foi realizada em tubos cônicos de 15 mL, sendo depositados 1.600 µL do gradiente ao fundo e, sobre estes, 800 µL de sêmen, utilizando-se uma força centrífuga de 400 G por 20 minutos. A centrifugação com EQP foi realizada em tubos cônicos de 15 mL, sendo depositados 800 µL de gradiente ao fundo e, sobre estes, 800 µL de sêmen, com força centrífuga de 400 G por 30 minutos. Em ambos os gradientes o sobrenadante foi removido por aspiração e o *pellet* ressuspendido em Botucio<sup>®</sup>.

### 2.5.3 Avaliação seminal

Após a colheita do sêmen avaliaram-se as variáveis: volume (mL), motilidade (%) / vigor (escore 0 – 5), concentração ( $\times 10^6$  / mL), morfologia espermática (%), viabilidade e *status* acrossomal (Didion et al., 1989), atividade mitocondrial (Hrudka, 1987) e susceptibilidade ao estresse oxidativo, pela avaliação do nível de lipoperoxidação (Nichi et al., 2007). Após a descongelação e centrifugação, à exceção do volume, as demais variáveis foram analisadas. As avaliações do sêmen foram efetuadas nos momentos pós-colheita (PC), pós-descongelação (PD) e pós-centrifugação (PCT).

### 2.5.4 Motilidade e vigor espermáticos



A avaliação subjetiva da motilidade foi feita através de microscopia de contraste de fase com objetiva de 40x, com uma gota de sêmen depositada entre lâmina e lamínula pré-aquecidas a 37°C. A estimativa da motilidade foi feita pela determinação da proporção de espermatozoides móveis (0 a 100%) e, para o vigor, foi considerada a intensidade do movimento espermático, atribuindo-se um escore de 0 (ausência de movimento) a 5 (movimentos intensos).

#### *2.5.5 Concentração espermática*

Para a estimativa da concentração espermática, 5 µL de sêmen foram depositados em 95 µL de água e a contagem feita com Câmara de Neubauer, através de microscopia de campo claro, com objetiva de 40x. O número médio de espermatozoides obtido, pela contagem de cinco quadrados em cada retículo, foi multiplicado por  $1 \times 10^6$ , o que resultou na determinação da concentração de espermatozoides / mL.

#### *2.5.6 Morfologia espermática*

Amostras de sêmen destinadas à avaliação morfológica foram conservadas em solução de formol-salina-tamponada. Analisou-se 200 células/lâmina, em preparações úmidas, sob microscopia de contraste de fase, em aumento de 1.000x. As patologias espermáticas foram classificadas de acordo com o proposto por Blom (1973) citado por Barth e Oko (1989), e os resultados expressos em percentagem.

#### *2.5.7 Viabilidade e status acrossomal*

Para a avaliação simultânea da viabilidade e *status* acrossomal foi empregada a técnica da dupla coloração descrita por Didion et al. (1989), que utiliza os corantes

*trypan blue* / Giemsa. O *trypan blue* é um corante vital que detecta espermatozoides mortos, com membrana lesada, corando-os em azul, enquanto os íntegros não se coram. Já o Giemsa indica a presença ou ausência do acrossomo, corando de rosa os acrossomos intactos. Em *eppendorf* foram co-incubados 20 µL de *trypan blue* (Sigma Aldrich do Brasil) e 20 µL de sêmen, a 37°C em termobloco (*Accublock<sup>TM</sup>*, *Labnet International, Inc.*), por 15 minutos. Após, foi feito o esfregaço, sendo a lâmina seca sobre placa aquecedora a 37°C e, então, fixada em metanol por 5 minutos. As lâminas foram lavadas com água deionizada e após estarem secas eram imersas, *overnight*, em solução corante de Giemsa (Merck Brasil), preparada em cubeta plástica com 27 mL de água deionizada acrescidos de 3 mL da solução estoque de Giemsa. Após este período as lâminas eram lavadas com água deionizada e secas à temperatura ambiente para posterior leitura. Foram avaliadas 200 células por lâmina, em microscópio de campo claro, no aumento de 100x sob a imersão. Os espermatozoides foram classificados em: *vivos* – acrossomo corado em rosa pelo Giemsa e região pós-acrossomal não corada; *mortos* – acrossomo corado em rosa pelo Giemsa e região pós-acrossomal corada em azul pelo *trypan blue*; *reação de acrossomo verdadeira (RAV)* – acrossomo e região pós-acrossomal não corados e; *reação de acrossomo falsa (RAF)* – acrossomo não corado e região pós-acrossomal corada em azul pelo *trypan blue*.

#### 2.5.8 Atividade mitocondrial

Para a determinação da atividade mitocondrial foi empregada a técnica descrita por Hrudka (1987), que se baseia na oxidação da 3,3'-diaminobenzidina 4,4'-tetraaminobiphenyl (DAB) pelo Complexo Citocromo C, resultando na polimerização e deposição do DAB nas mitocôndrias da peça intermediária. Em

*ependorf* foram armazenados, ao abrigo da luz, 10  $\mu$ L da solução de DAB (1 mg/mL em tampão fosfato salina - PBS), acrescidos de 10  $\mu$ L de sêmen e, incubados a 37°C em termobloco por 60 minutos. Após, foi feito o esfregaço e as lâminas secas à temperatura ambiente, com posterior fixação em formol a 10% por 10 minutos. Através da microscopia de contraste de fase, em aumento de 100x sob a imersão, as células foram classificadas, de acordo com a extensão da coloração da bainha mitocondrial, em: DAB I – 100% corada, alta atividade mitocondrial; DAB II - > 50% corada, predominância de áreas ativas; DAB III - < 50% corada, predominância de áreas inativas, e DAB IV – 0% corada, sem atividade mitocondrial.

#### 2.5.9 Lipoperoxidação

A avaliação foi feita de forma indireta, através da mensuração da concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com Nichi et al. (2007). Foi determinada a concentração espermática em cada momento da avaliação, considerando-se um mínimo de  $5 \times 10^5$ . Uma alíquota de 400  $\mu$ L de sêmen, acondicionada em *ependorf*, foi lavada em PBS, sendo para tanto adicionados 1.600  $\mu$ L deste e efetuada a centrifugação a 800 G por 10 minutos, a seguir o sobrenadante era descartado. O processo de lavagem foi realizado duas vezes e, ao final, o *pellet* resultante ressuspendido em 400  $\mu$ L de PBS. A peroxidação lipídica foi induzida pela adição de sulfato de ferro (100  $\mu$ L, 4 mM) e ácido ascórbico (100  $\mu$ L, 20 mM) aos 400  $\mu$ L da amostra, a qual era, então, homogeneizada e incubada a 37°C por 90 minutos, em termobloco. Após a incubação, foram acrescidos 1.200  $\mu$ L de ácido tricloroacético a 10% (TCA) para, então, submeter à centrifugação a 14.100 G por 10 minutos, com a finalidade de separar as proteínas precipitadas. Na sequência, o sobrenadante (800  $\mu$ L) foi

retirado por aspiração, acondicionado em criotubos e mantido a -20°C para posterior análise. A amostra foi descongelada a temperatura ambiente e, a uma alíquota de 800 µL foram acrescidos 800 µL de ácido tiobarbitúrico a 1% (TBA), com incubação a 90°C – 100°C durante 15 minutos, em banho-maria (FANEM LTDA., Guarulhos/SP, Brasil). Após ser resfriada em banho de gelo (0°C), com a finalidade de promover a interrupção da reação termo dependente, a leitura das amostras foi realizada através de espectrofotometria, em comprimento de onda de 532 nm e os resultados comparados com uma curva padrão, previamente estabelecida, de malondialdeído (MDA). A concentração do TBARS foi determinada utilizando um coeficiente de extinção molar do MDA ( $1,56 \times 10^5 \times \text{M/mL}$ ), e expressa em nanogramas de MDA por  $10^8$  de espermatozoides (ng/ $10^8$  sptz).

## 2.6 Análise Estatística

O delineamento experimental foi em parcelas subdivididas, considerando a adição de glutathione reduzida em suas diferentes concentrações como tratamento e os momentos de avaliação como subparcelas. Para comparar as variáveis que não apresentaram normalidade (motilidade, vigor, morfologia espermática, viabilidade /status acrossomal e atividade mitocondrial) foi usada a análise não paramétrica. As médias dos tratamentos (C, GSH 3, GSH 5 e GSH 7) e das centrifugações (ADC e EQP) foram comparadas pelo teste de *Kruskal-Wallis*, através do procedimento NPAR1WAY do Programa Estatístico SAS (2001) e, as médias dos momentos pelo teste de *Bonferroni*, utilizando o procedimento GLM do Programa Estatístico SAS (2001), ambos em nível de 5% de significância. Para comparar as variáveis que apresentaram normalidade (taxa de recuperação e lipoperoxidação) foi usada a análise de variância, pelo procedimento GLM do Programa Estatístico SAS (2001). A variável lipoperoxidação foi transformada em  $\log_{10}$ . As médias dos tratamentos e dos

momentos (pós-colheita, pós-descongelamento e pós-centrifugação – ADC ou EQP) foram comparadas pelo teste de *Duncan* e, as médias das centrifugações (ADC e EQP) pelo teste *t de Student*, ambos em nível de 5% de significância. Para análise da associação entre a lipoperoxidação e as demais variáveis, foram estimados os coeficientes de correlação de *Spearman*, pelo procedimento CORR do Programa Estatístico SAS (2001), considerando-se nível de 5% de significância.

### 3 Resultados

A adição da GSH, nas concentrações de 3 mM e 5 mM, não teve efeito significativo sobre as variáveis motilidade e vigor, no entanto, para a concentração de 7 mM detectou-se uma redução ( $P < 0,05$ ) desses valores (Tab. 1).

As variáveis morfologia espermática, viabilidade/*status* acrossomal e atividade mitocondrial não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos. Contudo, ao se considerar os momentos em que foram feitas as avaliações, após a centrifugação nos gradientes, os valores das classes de viabilidade/*status* acrossomal e atividade mitocondrial diferiram ( $P < 0,05$ ) daqueles obtidos para o sêmen fresco (Tab. 2; Tab. 3).

Quando comparadas as alterações morfológicas presentes no sêmen pós-descongelamento e após a centrifugação nos gradientes, observou-se menor proporção de células apresentando gota citoplasmática proximal (ADC – 1,07%; EQP – 0,94% vs. 2,57%;  $P < 0,05$ ), anormalidades da peça intermediária (ADC – 1,65%; EQP – 1,63% vs. 2,62%;  $P < 0,05$ ), cauda dobrada (ADC – 0,99%; EQP – 0,97% vs. 2,35%;  $P < 0,05$ ) e enrolada (ADC – 0,23%; EQP – 0,14% vs. 0,58%;  $P < 0,05$ ) em ambos os gradientes e, cauda fortemente enrolada quando utilizado o EQP (0,46% vs. 0,92%;  $P < 0,05$ ). No entanto, houve um aumento da frequência de

cabeça isolada normal (ADC – 6,77%; EQP – 9,00% vs. 3,62%;  $P < 0,05$ ) e ausência de diferença estatística quanto ao total de espermatozoides morfologicamente normais (ADC – 76,64%; EQP – 75,18% vs. 73,39%;  $P > 0,05$ ).

Tabela 1. Médias ( $\pm$  desvio padrão) das variáveis do sêmen criopreservado de garanhões da raça Quarto de Milha ( $n=19$ ), de acordo com as concentrações de glutathiona reduzida adicionadas ao diluidor de congelamento

| Variáveis seminais                              |         | Tratamentos                   |                              |                               |                              |
|-------------------------------------------------|---------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
|                                                 | Classes | Controle                      | GSH 3 mM                     | GSH 5 mM                      | GSH 7 mM                     |
| Motilidade (%)                                  |         | 72,2 $\pm$ 10,1 <sup>a</sup>  | 71,3 $\pm$ 12,8 <sup>a</sup> | 67,3 $\pm$ 15,4 <sup>a</sup>  | 52,1 $\pm$ 26,0 <sup>b</sup> |
| Vigor (0-5)                                     |         | 3,1 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>    | 3,0 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>   | 2,9 $\pm$ 0,7 <sup>ab</sup>   | 2,6 $\pm$ 1,0 <sup>b</sup>   |
| <i>Trypan blue</i> /<br>Giemsa (%)              | Vivo    | 59,2 $\pm$ 17,9               | 59,9 $\pm$ 15,9              | 59,5 $\pm$ 15,4               | 59,9 $\pm$ 15,5              |
|                                                 | Morto   | 21,3 $\pm$ 9,9                | 21,8 $\pm$ 9,5               | 22,3 $\pm$ 8,9                | 23,2 $\pm$ 9,3               |
|                                                 | RAV     | 0,9 $\pm$ 1,2                 | 0,7 $\pm$ 1,1                | 0,7 $\pm$ 1,1                 | 0,8 $\pm$ 1,1                |
|                                                 | RAF     | 18,7 $\pm$ 11,0               | 17,6 $\pm$ 12,4              | 17,6 $\pm$ 11,1               | 16,2 $\pm$ 10,9              |
| DAB (%)                                         | I       | 45,1 $\pm$ 18,7               | 42,9 $\pm$ 21,2              | 41,7 $\pm$ 20,3               | 38,8 $\pm$ 21,1              |
|                                                 | II      | 24,9 $\pm$ 12,9               | 24,2 $\pm$ 12,2              | 26,7 $\pm$ 11,7               | 25,8 $\pm$ 12,7              |
|                                                 | III     | 9,2 $\pm$ 7,3                 | 9,5 $\pm$ 8,0                | 8,9 $\pm$ 8,1                 | 10,3 $\pm$ 9,3               |
|                                                 | IV      | 20,9 $\pm$ 16,5               | 23,4 $\pm$ 19,4              | 22,7 $\pm$ 20,1               | 25,2 $\pm$ 20,1              |
| Recuperação<br>espermática (%)                  |         | 38,3 $\pm$ 15,6 <sup>AB</sup> | 44,3 $\pm$ 15,3 <sup>A</sup> | 40,9 $\pm$ 13,6 <sup>AB</sup> | 35,5 $\pm$ 21,1 <sup>B</sup> |
| TBARS [ng / 10 <sup>8</sup><br>espermatozoides] |         | 1.218,5 $\pm$ 1.034,4         | 1.004,4 $\pm$ 782,9          | 1.016,7 $\pm$ 814,1           | 1.290,4 $\pm$ 1.126,6        |

<sup>a, b</sup> Letras minúsculas diferentes na linha indicam diferença significativa entre médias pelo teste de *Kruskal-Wallis* ( $P < 0,05$ )

<sup>A, B</sup> Letras maiúsculas diferentes na linha indicam diferença significativa entre médias pelo teste de *Duncan* ( $P < 0,05$ )

GSH – glutathiona reduzida; DAB – 3,3'-diaminobenzidina; TBARS – espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico; RAV – reação do acrossomo verdadeira; RAF – reação do acrossomo falsa

Os níveis de lipoperoxidação não diferiram ( $P > 0,05$ ) entre as concentrações de GSH testadas e o grupo controle (Tab. 1). Dentre os momentos avaliados, a lipoperoxidação foi significativamente maior após a descongelamento e a passagem do sêmen em ambos os gradientes de única camada (Tab. 2; Tab. 3).

Considerando os resultados da interação entre tratamentos x momentos, a motilidade e o vigor pós-descongelamento foram inferiores ( $P < 0,05$ ) aos valores obtidos para o sêmen fresco. Nos grupos controle, GSH 3 e GSH 5 a motilidade pós-centrifugação mostrou-se significativamente maior que a observada após a descongelamento, não diferindo do pós-colheita ( $P > 0,05$ ; Tab. 4; Tab. 5). Para o grupo

GSH 7, a motilidade, após a centrifugação nos gradientes, resultou em valores superiores ( $P<0,05$ ) àqueles pós-descongelamento, embora inferiores ( $P<0,05$ ) aos obtidos após a colheita do sêmen. Para a variável vigor, considerando os tratamentos com glutathione reduzida, após a passagem pelos gradientes, seus resultados foram superiores aos observados pós-descongelamento ( $P<0,05$ ; Tab. 4; Tab. 5), sendo iguais àqueles apresentados após a colheita do sêmen, com exceção do grupo GSH 7 que teve valores superiores ( $P<0,05$ ) ao pós-descongelamento, no entanto, inferiores ao pós-colheita ( $P<0,05$ ).

Tabela 2. Médias ( $\pm$  desvio padrão) das variáveis do sêmen criopreservado de garanhões da raça Quarto de Milha ( $n=19$ ), nos diferentes momentos de avaliação, utilizando a centrifugação com Androcoll-E®

| Variáveis seminais                  |         | Momentos            |                     |                                |
|-------------------------------------|---------|---------------------|---------------------|--------------------------------|
|                                     | Classes | Pós-colheita        | Pós-descongelamento | Pós-centrifugação Androcoll-E® |
| Motilidade (%)                      |         | $73,7 \pm 4,9^a$    | $46,8 \pm 19,3^b$   | $68,9 \pm 16,2^a$              |
| Vigor (0-5)                         |         | $3,4 \pm 0,5^a$     | $2,1 \pm 0,9^c$     | $3,0 \pm 0,4^b$                |
| Trypan blue / Giemsa (%)            | Vivo    | $77,4 \pm 9,4^a$    | $51,1 \pm 12,4^b$   | $54,3 \pm 12,7^b$              |
|                                     | Morto   | $15,2 \pm 9,6^a$    | $26,7 \pm 8,8^b$    | $24,7 \pm 7,9^b$               |
|                                     | RAV     | $0,2 \pm 0,4^a$     | $0,8 \pm 1,2^b$     | $1,1 \pm 1,4^b$                |
|                                     | RAF     | $7,3 \pm 6,7^a$     | $22,4 \pm 10,7^b$   | $19,9 \pm 9,7^b$               |
| DAB (%)                             | I       | $65,3 \pm 12,6^a$   | $29,6 \pm 14,7^c$   | $37,7 \pm 16,5^b$              |
|                                     | II      | $19,2 \pm 10,6^a$   | $22,3 \pm 10,3^a$   | $30,3 \pm 12,3^b$              |
|                                     | III     | $3,8 \pm 1,5^a$     | $9,0 \pm 7,0^b$     | $11,7 \pm 8,3^c$               |
|                                     | IV      | $11,7 \pm 12,2^a$   | $39,0 \pm 17,7^c$   | $20,3 \pm 17,7^b$              |
| Recuperação espermática (%)         |         | .                   | .                   | $42,6 \pm 16,5$                |
| TBARS [ng / $10^8$ espermatozoides] |         | $568,5 \pm 565,9^A$ | $731,3 \pm 557,7^B$ | $1.440,6 \pm 946,0^C$          |

<sup>a, b, c</sup> Letras minúsculas diferentes na linha indicam diferença significativa entre médias pelo teste de Bonferroni ( $P<0,05$ )

<sup>A, B, C</sup> Letras maiúsculas diferentes na linha indicam diferença significativa entre médias pelo teste de Duncan ( $P<0,05$ )

DAB – 3,3'-diaminobenzidina; TBARS – espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico; RAV – reação do acrossomo verdadeira; RAF – reação do acrossomo falsa

Ao se comparar com os valores observados no sêmen descongelado, após a centrifugação houve redução de células apresentando gota citoplasmática proximal nos tratamentos controle (3,13% vs. 0,97%;  $P<0,05$ ) e GSH 3 (2,18% vs. 0,92%;  $P<0,05$ ) quando utilizado o ADC e, nos tratamentos GSH 3 (2,18% vs. 0,92%;

P<0,05), GSH 5 (2,58% vs. 1,00%; P<0,05) e GSH 7 (2,39% vs. 0,95%; P<0,05), quando usado o EQP. No entanto, houve aumento da proporção de cabeça isolada normal (P<0,05) em todos os tratamentos após a centrifugação em ambos os gradientes (ADC e EQP; controle – 6,47%, 8,50%; GSH 3 – 6,82%, 7,79%; GSH 5 – 6,26%, 7,79%; GSH 7 – 7,53%, 11,89%, respectivamente), quando comparado ao sêmen fresco (1,47%). A taxa de recuperação espermática apresentou correlação positiva (P<0,05) com a morfologia normal pós-descongelção (ADC -  $r=0,26$ ; EQP -  $r=0,32$ ).

Tabela 3. Médias ( $\pm$  desvio padrão) das variáveis do sêmen criopreservado de garanhões da raça Quarto de Milha (n=19), nos diferentes momentos de avaliação, utilizando a centrifugação com EquiPure™

| Variáveis seminais                           |         | Momentos                       |                                |                                    |
|----------------------------------------------|---------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
|                                              | Classes | Pós-colheita                   | Pós-descongelção               | Pós-centrifugação EquiPure™        |
| Motilidade (%)                               |         | 73,7 $\pm$ 4,9 <sup>a</sup>    | 46,8 $\pm$ 19,3 <sup>b</sup>   | 73,4 $\pm$ 17,1 <sup>a</sup>       |
| Vigor (0-5)                                  |         | 3,4 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>     | 2,1 $\pm$ 0,9 <sup>c</sup>     | 3,0 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>         |
| Trypan blue / Giemsa (%)                     | Vivo    | 77,4 $\pm$ 9,4 <sup>a</sup>    | 51,1 $\pm$ 12,4 <sup>b</sup>   | 55,7 $\pm$ 13,4 <sup>b</sup>       |
|                                              | Morto   | 15,2 $\pm$ 9,6 <sup>a</sup>    | 26,7 $\pm$ 8,8 <sup>b</sup>    | 23,0 $\pm$ 7,4 <sup>b</sup>        |
|                                              | RAV     | 0,2 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>     | 0,8 $\pm$ 1,2 <sup>b</sup>     | 0,9 $\pm$ 1,2 <sup>b</sup>         |
|                                              | RAF     | 7,3 $\pm$ 6,7 <sup>a</sup>     | 22,4 $\pm$ 10,7 <sup>b</sup>   | 20,4 $\pm$ 11,0 <sup>b</sup>       |
| DAB (%)                                      | I       | 65,3 $\pm$ 12,6 <sup>a</sup>   | 29,6 $\pm$ 14,7 <sup>c</sup>   | 35,8 $\pm$ 16,3 <sup>b</sup>       |
|                                              | II      | 19,2 $\pm$ 10,6 <sup>a</sup>   | 22,3 $\pm$ 10,3 <sup>a</sup>   | 29,8 $\pm$ 12,5 <sup>b</sup>       |
|                                              | III     | 3,8 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup>     | 9,0 $\pm$ 7,0 <sup>b</sup>     | 13,4 $\pm$ 9,8 <sup>c</sup>        |
|                                              | IV      | 11,7 $\pm$ 12,2 <sup>a</sup>   | 39,0 $\pm$ 17,7 <sup>c</sup>   | 21,1 $\pm$ 17,1 <sup>b</sup>       |
| Recuperação espermática (%)                  |         | .                              | .                              | 37,0 $\pm$ 16,7                    |
| TBARS [ng / 10 <sup>8</sup> espermatozoides] |         | 568,5 $\pm$ 565,9 <sup>A</sup> | 731,3 $\pm$ 557,7 <sup>B</sup> | 1.789,6 $\pm$ 1.061,2 <sup>C</sup> |

<sup>a, b, c</sup> Letras minúsculas diferentes na linha indicam diferença significativa entre médias pelo teste de Bonferroni (P<0,05)

<sup>A, B</sup> Letras maiúsculas diferentes na linha indicam diferença significativa entre médias pelo teste de Duncan (P<0,05)

DAB – 3,3'-diaminobenzidina; TBARS – espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico; RAV – reação do acrossomo verdadeira; RAF – reação do acrossomo falsa

Na avaliação da viabilidade/status acrossomal, todos os momentos apresentaram um número menor de espermatozoides vivos (P<0,05) e maior proporção de RAF (P<0,05), quando comparados ao momento PC (Tab. 4; Tab. 5).



Tabela 4. Médias ajustadas ( $\pm$  desvio padrão) das variáveis motilidade, vigor e viabilidade e *status* acrossomal (*Trypan Blue* / Giemsa - TBG) do sêmen criopreservado de garanhões da raça Quarto de Milha (n=19), considerando a interação entre os tratamentos e os momentos de avaliação, utilizando a centrifugação com Androcoll-E®

| Variáveis seminais | Momentos | Tratamentos                    |                                |                                |                                |
|--------------------|----------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
|                    |          | Controle                       | GSH 3 mM                       | GSH 5 mM                       | GSH 7 mM                       |
| Motilidade (%)     | PC       | 73,7 $\pm$ 5,0 <sup>A</sup>    | 73,7 $\pm$ 5,0 <sup>A</sup>    | 73,7 $\pm$ 5,0 <sup>A</sup>    | 73,7 $\pm$ 5,0 <sup>A</sup>    |
|                    | PD       | 61,1 $\pm$ 11,0 <sup>a B</sup> | 55,8 $\pm$ 13,9 <sup>a B</sup> | 45,3 $\pm$ 13,5 <sup>b B</sup> | 25,3 $\pm$ 16,1 <sup>c C</sup> |
|                    | ADC      | 74,2 $\pm$ 6,1 <sup>a A</sup>  | 74,7 $\pm$ 7,0 <sup>a A</sup>  | 73,7 $\pm$ 7,6 <sup>a A</sup>  | 53,2 $\pm$ 24,5 <sup>b B</sup> |
| Vigor (0-5)        | PC       | 3,4 $\pm$ 0,5 <sup>A</sup>     | 3,4 $\pm$ 0,5 <sup>A</sup>     | 3,4 $\pm$ 0,5 <sup>A</sup>     | 3,4 $\pm$ 0,5 <sup>A</sup>     |
|                    | PD       | 2,7 $\pm$ 0,5 <sup>a B</sup>   | 2,5 $\pm$ 0,8 <sup>ab B</sup>  | 2,1 $\pm$ 0,8 <sup>b B</sup>   | 1,2 $\pm$ 0,7 <sup>c C</sup>   |
|                    | ADC      | 3,1 $\pm$ 0,2 <sup>A</sup>     | 3,1 $\pm$ 0,3 <sup>A</sup>     | 3,0 $\pm$ 0,0 <sup>A</sup>     | 2,8 $\pm$ 0,7 <sup>B</sup>     |
| Vivo               | PC       | 78,2 $\pm$ 9,2 <sup>A</sup>    | 78,2 $\pm$ 9,2 <sup>A</sup>    | 78,2 $\pm$ 9,2 <sup>A</sup>    | 78,2 $\pm$ 9,2 <sup>A</sup>    |
|                    | PD       | 51,8 $\pm$ 13,1 <sup>B</sup>   | 50,0 $\pm$ 14,1 <sup>B</sup>   | 49,8 $\pm$ 12,4 <sup>B</sup>   | 52,9 $\pm$ 10,4 <sup>B</sup>   |
|                    | ADC      | 54,2 $\pm$ 13,4 <sup>B</sup>   | 56,9 $\pm$ 13,0 <sup>B</sup>   | 54,2 $\pm$ 11,9 <sup>B</sup>   | 51,7 $\pm$ 12,9 <sup>B</sup>   |
| Mortos             | PC       | 12,4 $\pm$ 7,6 <sup>A</sup>    | 12,4 $\pm$ 7,6 <sup>A</sup>    | 12,4 $\pm$ 7,6 <sup>A</sup>    | 12,4 $\pm$ 7,6 <sup>A</sup>    |
|                    | PD       | 24,9 $\pm$ 9,7 <sup>B</sup>    | 26,3 $\pm$ 8,8 <sup>B</sup>    | 25,3 $\pm$ 9,7 <sup>B</sup>    | 26,2 $\pm$ 7,6 <sup>B</sup>    |
|                    | ADC      | 24,9 $\pm$ 8,5 <sup>ab B</sup> | 21,1 $\pm$ 7,5 <sup>a AB</sup> | 24,7 $\pm$ 6,4 <sup>ab B</sup> | 28,1 $\pm$ 8,1 <sup>b B</sup>  |
| TBG (%)            | PC       | 0,1 $\pm$ 0,2 <sup>A</sup>     | 0,1 $\pm$ 0,2 <sup>A</sup>     | 0,1 $\pm$ 0,2                  | 0,1 $\pm$ 0,2 <sup>A</sup>     |
|                    | PD       | 1,2 $\pm$ 1,4 <sup>B</sup>     | 0,8 $\pm$ 0,8 <sup>AB</sup>    | 0,8 $\pm$ 1,4                  | 0,5 $\pm$ 0,8 <sup>AB</sup>    |
|                    | ADC      | 1,3 $\pm$ 1,4 <sup>B</sup>     | 1,2 $\pm$ 1,8 <sup>B</sup>     | 0,9 $\pm$ 1,4                  | 1,0 $\pm$ 0,9 <sup>B</sup>     |
| RAV                | PC       | 0,1 $\pm$ 0,2 <sup>A</sup>     | 0,1 $\pm$ 0,2 <sup>A</sup>     | 0,1 $\pm$ 0,2                  | 0,1 $\pm$ 0,2 <sup>A</sup>     |
|                    | PD       | 1,2 $\pm$ 1,4 <sup>B</sup>     | 0,8 $\pm$ 0,8 <sup>AB</sup>    | 0,8 $\pm$ 1,4                  | 0,5 $\pm$ 0,8 <sup>AB</sup>    |
|                    | ADC      | 1,3 $\pm$ 1,4 <sup>B</sup>     | 1,2 $\pm$ 1,8 <sup>B</sup>     | 0,9 $\pm$ 1,4                  | 1,0 $\pm$ 0,9 <sup>B</sup>     |
| RAF                | PC       | 9,4 $\pm$ 7,6 <sup>A</sup>     | 9,4 $\pm$ 7,6 <sup>A</sup>     | 9,4 $\pm$ 7,6 <sup>A</sup>     | 9,4 $\pm$ 7,6 <sup>A</sup>     |
|                    | PD       | 22,1 $\pm$ 9,7 <sup>B</sup>    | 22,8 $\pm$ 13,4 <sup>B</sup>   | 24,2 $\pm$ 9,2 <sup>B</sup>    | 20,4 $\pm$ 10,6 <sup>B</sup>   |
|                    | ADC      | 19,7 $\pm$ 7,3 <sup>B</sup>    | 20,8 $\pm$ 11,6 <sup>B</sup>   | 20,2 $\pm$ 10,8 <sup>B</sup>   | 19,2 $\pm$ 9,2 <sup>B</sup>    |

a, b, c Letras minúsculas diferentes na linha indicam diferença significativa entre médias pelo teste de *Kruskal-Wallis* ( $P < 0,05$ )

A, B, C Letras maiúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa entre médias pelo teste *Bonferroni* ( $P < 0,05$ )

GSH – glutatona reduzida; PC – pós-colheita; PD – pós-descongelção; ADC – pós-Androcoll-E®

No que se refere à atividade mitocondrial, houve aumento significativo do número de células da classe DAB III após a descongelção, nos tratamentos controle e GSH 3, já para a classe DAB IV foi observado aumento de sua proporção ( $P < 0,05$ ) em todos os tratamentos (Fig. 2). Os dados referentes à classe de alta atividade mitocondrial, após a centrifugação, diferiram ( $P < 0,05$ ) dos valores apresentados pós-colheita, no entanto a classe de inatividade mitocondrial foi semelhante, em ambos os gradientes. Comparando com o momento pós-descongelção os grupos GSH 3 e GSH 5, após a passagem pelos gradientes, apresentaram maior ( $P < 0,05$ ) proporção de células DAB I (Fig. 2; Fig. 3). Para a taxa

de recuperação espermática não houve diferença significativa entre os tratamentos e os gradientes (ADC e EQP; Tab. 6).

Tabela 5. Médias ajustadas ( $\pm$  desvio padrão) das variáveis motilidade, vigor e viabilidade e *status* acrossomal (*Trypan Blue* / Giemsa - TBG) do sêmen criopreservado de garanhões da raça Quarto de Milha (n=19), considerando a interação entre os tratamentos e os momentos de avaliação, utilizando a centrifugação com EquiPure™

| Variáveis seminais | Momentos | Tratamentos                    |                                |                                |                                |
|--------------------|----------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
|                    |          | Controle                       | GSH 3                          | GSH 5                          | GSH 7                          |
| Motilidade (%)     | PC       | 73,7 $\pm$ 5,0 <sup>A</sup>    | 73,7 $\pm$ 5,0 <sup>A</sup>    | 73,7 $\pm$ 5,0 <sup>A</sup>    | 73,7 $\pm$ 5,0 <sup>A</sup>    |
|                    | PD       | 61,1 $\pm$ 11,0 <sup>a B</sup> | 55,8 $\pm$ 13,9 <sup>a B</sup> | 45,3 $\pm$ 13,5 <sup>b B</sup> | 25,3 $\pm$ 16,1 <sup>c C</sup> |
|                    | EQP      | 80,0 $\pm$ 6,7 <sup>ab A</sup> | 81,1 $\pm$ 6,6 <sup>a A</sup>  | 76,3 $\pm$ 6,0 <sup>b A</sup>  | 56,3 $\pm$ 25,9 <sup>c B</sup> |
| Vigor (0-5)        | PC       | 3,4 $\pm$ 0,5 <sup>A</sup>     | 3,4 $\pm$ 0,5 <sup>A</sup>     | 3,4 $\pm$ 0,5 <sup>A</sup>     | 3,4 $\pm$ 0,5 <sup>A</sup>     |
|                    | PD       | 2,7 $\pm$ 0,5 <sup>a B</sup>   | 2,5 $\pm$ 0,8 <sup>ab B</sup>  | 2,1 $\pm$ 0,8 <sup>b B</sup>   | 1,2 $\pm$ 0,7 <sup>c C</sup>   |
|                    | EQP      | 3,2 $\pm$ 0,4 <sup>A</sup>     | 3,1 $\pm$ 0,3 <sup>A</sup>     | 3,1 $\pm$ 0,3 <sup>A</sup>     | 2,8 $\pm$ 0,7 <sup>B</sup>     |
| TBG (%)            | Vivo     | PC                             | 78,2 $\pm$ 9,2 <sup>A</sup>    | 78,2 $\pm$ 9,2 <sup>A</sup>    | 78,2 $\pm$ 9,2 <sup>A</sup>    |
|                    |          | PD                             | 51,8 $\pm$ 13,1 <sup>B</sup>   | 50,0 $\pm$ 14,1 <sup>B</sup>   | 52,9 $\pm$ 10,4 <sup>B</sup>   |
|                    |          | EQP                            | 52,6 $\pm$ 15,8 <sup>B</sup>   | 55,6 $\pm$ 12,2 <sup>B</sup>   | 58,0 $\pm$ 13,9 <sup>B</sup>   |
|                    | Mortos   | PC                             | 12,4 $\pm$ 7,6 <sup>A</sup>    | 12,4 $\pm$ 7,6 <sup>A</sup>    | 12,4 $\pm$ 7,6 <sup>A</sup>    |
|                    |          | PD                             | 24,9 $\pm$ 9,7 <sup>B</sup>    | 26,3 $\pm$ 8,8 <sup>B</sup>    | 26,2 $\pm$ 7,6 <sup>B</sup>    |
|                    |          | EQP                            | 23,0 $\pm$ 8,6 <sup>B</sup>    | 23,7 $\pm$ 8,8 <sup>B</sup>    | 22,9 $\pm$ 5,8 <sup>AB</sup>   |
|                    | RAV      | PC                             | 0,1 $\pm$ 0,2 <sup>A</sup>     | 0,1 $\pm$ 0,2                  | 0,1 $\pm$ 0,2 <sup>A</sup>     |
|                    |          | PD                             | 1,2 $\pm$ 1,4 <sup>B</sup>     | 0,8 $\pm$ 0,8                  | 0,5 $\pm$ 0,8 <sup>AB</sup>    |
|                    |          | EQP                            | 0,9 $\pm$ 1,0 <sup>AB</sup>    | 0,6 $\pm$ 0,9                  | 1,2 $\pm$ 1,6 <sup>B</sup>     |
|                    | RAF      | PC                             | 9,4 $\pm$ 7,6 <sup>A</sup>     | 9,4 $\pm$ 7,6 <sup>A</sup>     | 9,4 $\pm$ 7,6 <sup>A</sup>     |
|                    |          | PD                             | 22,1 $\pm$ 9,7 <sup>B</sup>    | 22,8 $\pm$ 13,4 <sup>B</sup>   | 20,4 $\pm$ 10,6 <sup>B</sup>   |
|                    |          | EQP                            | 23,5 $\pm$ 12,9 <sup>B</sup>   | 20,2 $\pm$ 10,6 <sup>B</sup>   | 19,4 $\pm$ 9,4 <sup>B</sup>    |
|                    |          |                                |                                |                                | 18,6 $\pm$ 11,3 <sup>B</sup>   |

<sup>a, b</sup> Letras minúsculas diferentes na linha indicam diferença significativa entre médias pelo teste de *Kruskal-Wallis* ( $P < 0,05$ )

<sup>A, B, C</sup> Letras maiúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa entre médias pelo teste de *Bonferroni* ( $P < 0,05$ )

GSH – glutatona reduzida; PC – pós-colheita; PD – pós-descongelamento; EQP – pós-EquiPure™

Diferenças significativas entre os gradientes ADC ou EQP, respectivamente, foram observadas para motilidade nos tratamentos controle (74,2% vs. 80%) e GSH 3 (74,7% vs. 81,1%); cauda dobrada com gota distal no tratamento controle (0,13% vs. 0,00%); cauda enrolada no tratamento GSH 5 (0,29% vs. 0,53%); mortos no tratamento GSH 7 (28,1% vs. 22,2%) e; células com alta atividade mitocondrial no grupo controle (43,5% vs. 34,2%).

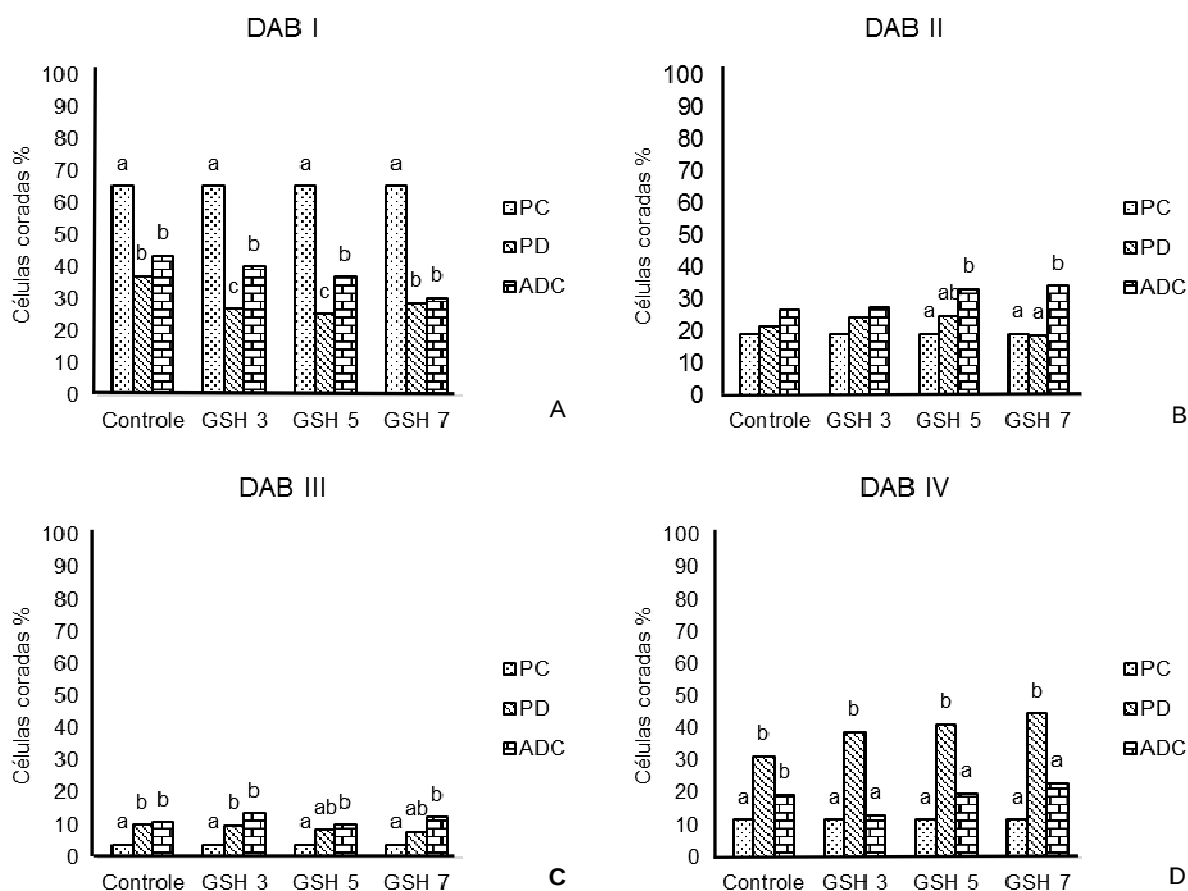


Figura 2. Proporção média de espermatozoides de acordo com as classes referentes à atividade mitocondrial (A; B; C e D) do sêmen criopreservado de garanhões da raça Quarto de Milha (n=19), considerando a interação entre os tratamentos e os momentos de avaliação, utilizando centrifugação com Androcoll-E®. Letras minúsculas indicam diferença significativa entre momentos pelo teste de *Bonferroni* ( $P < 0,05$ ); DAB I – 100% corada, alta atividade mitocondrial; DAB II - > 50% corada, predominância de áreas ativas; DAB III - < 50% corada, predominância de áreas inativas, e DAB IV – 0% corada, sem atividade mitocondrial; GSH – glutatona reduzida; PC – pós-colheita; PD – pós-descongelção; ADC - pós-Androcoll-E®

Quanto à lipoperoxidação, os grupos GSH 3 e GSH 5 não apresentaram aumento de seus níveis ( $P > 0,05$ ) após a descongelção, ao contrário dos grupos controle e GSH 7, quando houve aumento da concentração de TBARS (Fig. 4;  $P < 0,05$ ). Os valores de TBARS não diferiram entre os gradientes, para todos os tratamentos. Os níveis de lipoperoxidação foram superiores ( $P < 0,05$ ) aos apresentados pós-colheita e pós-descongelção, para todos os tratamentos, após a seleção espermática em ambos os gradientes. Os menores níveis de

lipoperoxidação foram obtidos para o sêmen fresco. Os valores mais altos de TBARS foram detectados após a passagem nos gradientes (Fig. 4).

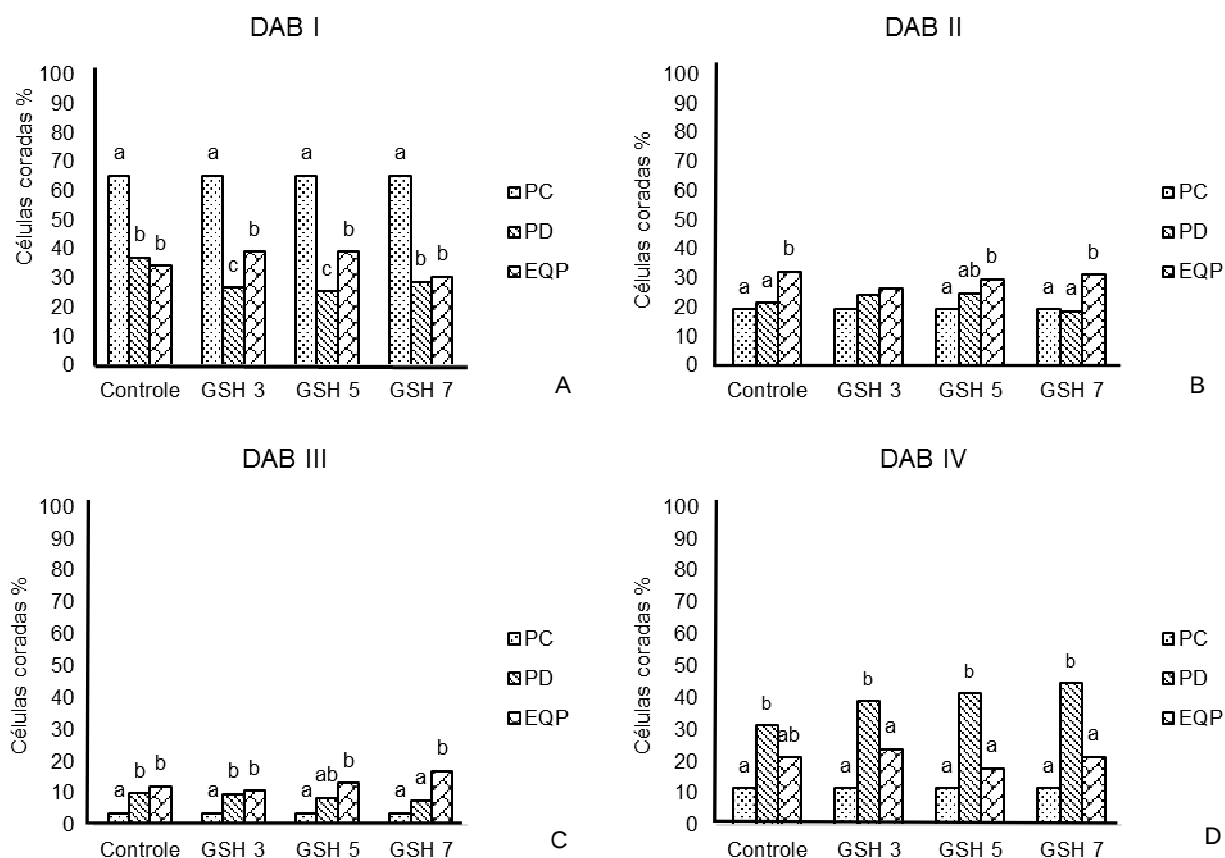


Figura 3. Proporção média de espermatozoides de acordo com as classes referentes à atividade mitocondrial (A; B; C e D) do sêmen criopreservado de garanhões da raça Quarto de Milha (n=19), considerando a interação entre os tratamentos e os momentos de avaliação, utilizando centrifugação com EquiPure™. Letras minúsculas indicam diferença significativa entre momentos pelo teste de Bonferroni (P<0,05); DAB I – 100% corada, alta atividade mitocondrial; DAB II - > 50% corada, predominância de áreas ativas; DAB III - < 50% corada, predominância de áreas inativas, e DAB IV – 0% corada, sem atividade mitocondrial; GSH – glutatona reduzida; PC – pós-colheita; PD – pós-descongelamento; EQP – pós-EquiPure™

Tabela 6. Médias ajustadas ( $\pm$  desvio padrão) das taxas de recuperação espermática (%) após centrifugação em gradiente de única camada do sêmen criopreservado de garanhões da raça Quarto de Milha (n=19), considerando a interação entre os tratamentos e os gradientes de única camada

| Gradientes   | Taxa de Recuperação Espermática (%) |                 |                 |                 |
|--------------|-------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|              | Controle                            | GSH 3 mM        | GSH 5 mM        | GSH 7 mM        |
| Androcoll-E® | 40,8 $\pm$ 16,1                     | 46,7 $\pm$ 16,7 | 42,5 $\pm$ 11,6 | 40,2 $\pm$ 20,9 |
| EquiPure™    | 35,8 $\pm$ 15,2                     | 42,0 $\pm$ 13,8 | 39,2 $\pm$ 15,6 | 30,9 $\pm$ 20,8 |

Médias na linha comparadas pelo teste de Duncan (P>0,05)

Médias na coluna comparadas pelo teste t de Student (P>0,05)

GSH – glutatona reduzida

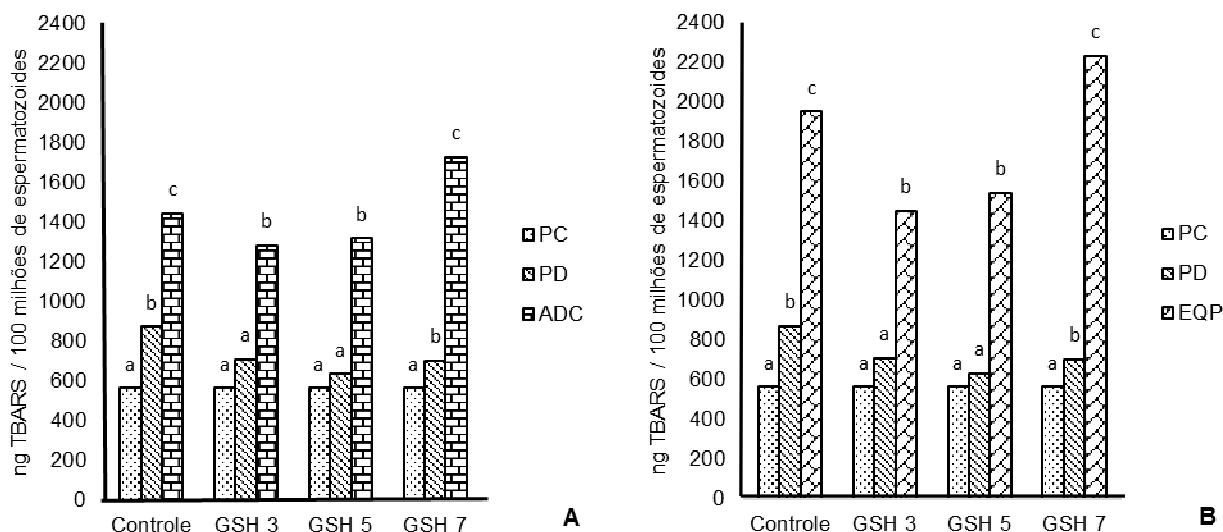


Figura 4. Médias ajustadas da variável lipoperoxidação do sêmen criopreservado de garanhões da raça Quarto de Milha (n=19), considerando a interação entre os tratamentos e os momentos de avaliação, de acordo com o gradiente de centrifugação utilizado (A - Androcoll-E®; B - EquiPure™). Letras minúsculas indicam diferença significativa entre momentos pelo teste de *Duncan* ( $P < 0,05$ ); GSH – glutationa reduzida; PC – pós-colheita; PD – pós-descongelação; ADC - pós-Androcoll-E®; EQP - pós-EquiPure™.

O nível de lipoperoxidação após a centrifugação do sêmen nos gradientes apresentou correlação significativa com células apresentando cabeça isolada normal (ADC -  $r=0,38$ ; EQP -  $r=0,31$ ;  $P < 0,05$ ). Após a centrifugação com ADC a lipoperoxidação foi correlacionada com a presença de gota citoplasmática proximal ( $r=0,30$ ;  $P < 0,05$ ) e total de gota citoplasmática ( $r=0,31$ ;  $P < 0,05$ ), enquanto para o EQP houve associação com gota citoplasmática distal ( $r=0,26$ ;  $P < 0,05$ ). Não foi observada correlação entre motilidade, viabilidade e alta atividade mitocondrial e os níveis de lipoperoxidação, em nenhum dos momentos avaliados.

#### 4 Discussão

No presente experimento as concentrações 3 mM e 5 mM de GSH, embora sem diferença significativa entre os tratamentos, mostraram ação antioxidante durante o processo de criopreservação, apresentando, após a descongelação, valores de lipoperoxidação semelhantes ao pós-colheita. Isto não ocorreu no grupo

controle e GSH 7 que apresentaram aumento desta variável. No entanto, este efeito protetor não foi observado para as variáveis motilidade, vigor, viabilidade/*status* acrossomal e atividade mitocondrial, diferindo do esperado.

A queda da motilidade é o primeiro sinal de uma produção excessiva de ROS e/ou da redução da capacidade antioxidante, que é acompanhada por alteração da função mitocondrial e, isto ocorre antes mesmo de serem detectados sinais de lipoperoxidação (Armstrong et al., 1999; Baumber et al., 2003a, 2000). Além disso, a lipoperoxidação causa a perda de ácidos graxos poli-insaturados (*polyunsaturated fatty acids* – PUFAs) presentes na membrana (Ferreira e Matsubara, 1997; Halliwell e Gutteridge, 1986), que são importantes para a motilidade e viabilidade espermáticas (Baumber et al., 2000).

Esperava-se um menor nível de lipoperoxidação, induzida pela criopreservação, nas amostras acrescidas de GSH, preservando, desta forma, uma maior motilidade, atividade mitocondrial e viabilidade, o que não foi observado no presente trabalho. Isto sugere que a redução nos valores destas variáveis após a descongelação esteja relacionada, principalmente, às lesões induzidas pelo próprio processo de criopreservação, predominantemente causados pelo estresse osmótico (Hammerstedt et al., 1990; Pommer et al., 2002).

Segundo Ortega-Ferrusola et al. (2009), um aumento da lipoperoxidação pós-descongelação, aparentemente, não é suficiente por si só para apresentar sinais evidentes de lesões induzidas pela criopreservação, mas pode desencadear alterações semelhantes a apoptose, as quais podem resultar em criodanos subletais nos espermatozoides vivos, levando ao envelhecimento precoce dos mesmos e consequente redução da sua vida útil após a descongelação. Estes danos subletais

podem ter ocorrido no presente experimento, no entanto, não foi possível sua detecção através das análises laboratoriais empregadas.

Câmara et al. (2011) não observaram efeito antioxidante da GSH (0,5, 1,0 e 2,0 mM) adicionada ao diluente de congelação de sêmen ovino, realizando as avaliações durante o período de equilíbrio do protocolo de congelação. Os autores levantaram a hipótese de que o diluente TRIS, formulado com gema de ovo *in natura*, teria tido uma significativa capacidade antioxidante, devido às lipoproteínas da gema do ovo, as quais são capazes de prevenir a oxidação dos PUFA's (Sakanaka et al., 2004). No presente experimento o diluente utilizado também apresenta gema de ovo em sua formulação, portanto, uma hipótese que não pode ser descartada.

Talvez o diluente à base de gema de ovo possa ter mascarado os resultados, não detectando-se diferença significativa do grupo GSH 3, que poderia resultar em maior motilidade e atividade mitocondrial, comparado ao controle. No entanto, a motilidade pós-descongelação do GSH 5 foi significativamente menor, comparada ao controle e ao GSH 3, sugerindo algum efeito deletério desta concentração.

Pesquisas sobre os efeitos da adição da GSH ao sêmen de mamíferos mostraram que sua ação é dose-dependente, ou seja, pode não apresentar efeito, ser tóxica, ou, mostrar-se efetivamente protetora para as células, sendo esta a ação antioxidante desejada (Gadea et al., 2007, 2005; Silva et al., 2011; Sinha et al., 1996).

Evidenciando este efeito, Sinha et al. (1996) testaram as concentrações 2 e 5 mM, adicionadas no diluente de congelação de sêmen caprino, e observaram menor anormalidade de acrossomo pós-descongelação quando tratado com GSH (8,62%; 6,97%, respectivamente, vs. 10,10%;  $P < 0,05$ ); no entanto, este efeito foi

significativamente menor quando usada a concentração de 5 mM. Gadea et al. (2005) acrescentando 1 e 5 mM de GSH no diluente de congelação de sêmen suíno, observaram maior motilidade pós-descongelação para o tratamento com 1 mM (37,50% vs. 26,11%;  $P < 0,05$ ). No presente experimento, também foi observado um efeito dose dependente da GSH, portanto, este é um aspecto que requer maiores estudos avaliando diferentes concentrações, até se determinar qual proporcionará a maior ação protetora possível.

As ROS devem ser continuamente inativadas para se ter apenas a concentração necessária para manter uma função fisiológica normal do espermatozoide (Agarwal et al., 2003), ou seja, a dose de antioxidante utilizada deve ser suficiente para inativar apenas as ROS geradas em excesso, levando em consideração que a baixa concentração destas é importante para a fisiologia normal da célula, como por exemplo na indução da capacitação (Ball et al., 2001; Baumber et al., 2003b; Burnaugh et al., 2007).

Levando em consideração a dose-dependência da ação da GSH, quando utilizada a concentração de 7 mM, foi observada uma ação tóxica, apresentando menores valores de motilidade e vigor ( $P < 0,05$ ) após a descongelação, quando comparado aos demais tratamentos e aumento da lipoperoxidação, comparado ao sêmen fresco. Este efeito também foi observado por Silva et al. (2011) para a mesma concentração (7 mM), no sêmen ovino, apresentando menor motilidade pós-descongelação (42,38%;  $P < 0,05$ ) quando comparado ao grupo controle (69,01%) e ao tratamento de 5 mM (55,45%), no entanto, o mesmo não diferiu ( $P > 0,05$ ) da concentração de 2 mM de GSH (49,45%). Os autores também observaram menor número de células com acrossomo íntegro e baixo potencial de membrana mitocondrial no tratamento com 7 mM. Este efeito tóxico leva a supor que se deve



trabalhar com doses de GSH abaixo de 7 mM para o sêmen equino e ovino, buscando-se atingir o efeito antioxidante desejado.

Por outro lado, Baumber et al. (2005) não observaram efeito tóxico, após a descongelação, testando 10 mM em sêmen equino. Isto pode ter ocorrido devido às diferenças na metodologia, como a raça dos garanhões (Puro Sangue Inglês e Árabe) e a composição do diluente de criopreservação, o INRA 82 com adição de 2,5% de glicerol. O INRA 82 é um diluente à base de leite, enquanto o Botucurio<sup>®</sup>, utilizado no presente experimento, tem como base a gema de ovo. No experimento de Silva et al. (2011) foi usado um diluente a base de gema de ovo (TRIS), o que leva a crer que, talvez, o efeito tóxico não seja resultado apenas da ação da GSH, e sim de alguma reação entre os constituintes dos diluentes.

A GSH pode agir diretamente sobre as ROS, mas sua principal função é servir como substrato para a GPx, que catalisa a redução de peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos tóxicos (Bilodeau et al., 2001; Meister, 1994). Como na espécie equina o plasma seminal é descartado ao final do processo de centrifugação, talvez se faça necessária a associação da GSH com a GPx, quando da adição ao diluente, potencializando sua ação antioxidante. Durante os procedimentos de criopreservação do sêmen suíno também é feita a remoção do plasma seminal. Gadea et al. (2004) testando a adição, pré-congelação, da GSH (5 mM) ao sêmen suíno não detectaram efeito antioxidante significativo. Baumber et al. (2003a) encontraram efeito significativo adicionando GSH (10 mM) ao sêmen equino fresco, ainda com o plasma seminal presente, mas Baumber et al. (2005) adicionando a mesma dose no diluente de criopreservação, não observaram efeito significativo.

Em espécies em que não se fez a retirada do plasma seminal para a congelação, o efeito antioxidante da adição da GSH pré-congelação foi significativo

(Silva et al., 2011 – ovino; Sinha et al., 1996 – caprino). Gadea et al. (2007) também obtiveram resultado significativo adicionando GSH (1 e 5 mM) após a descongelação do sêmen bovino, o que corrobora a hipótese da associação com GPx nas espécies em que se faz a retirada do plasma seminal no processo de criopreservação. No entanto, Gadea et al. (2005) observaram efeito significativo adicionando a GSH pré-congelação (1 e 5 mM).

Estudos demonstraram que a centrifugação em gradiente de densidade formulado com sílica revestida com glicidoxipropiltrimetoxissilano (silano; Androcoll-E®; EquiPure™), resulta em uma maior proporção de espermatozoides morfologicamente normais, com integridade das membranas plasmática e acrossomais e da cromatina, com alto potencial de membrana mitocondrial, associadas à uma maior motilidade espermática (Crespo et al., 2013; Johannisson et al., 2009; Macías-García et al., 2009; Morrell et al., 2011a, 2010a, 2009; Stoll et al., 2013; 2010). No presente experimento foi possível observar um aumento na motilidade e vigor ( $P < 0,05$ ), em todos os grupos experimentais, bem como de células com alta atividade mitocondrial, nos grupos GSH 3 e GSH 5 e redução das células com inatividade mitocondrial (DAB IV) ( $P < 0,05$ ), nos tratamentos com adição de GSH, e o controle quando centrifugado com o Androcoll-E®. No entanto, não foi observada diferença significativa quanto à morfologia normal e viabilidade/status acrossomal, o que era esperado, pois o mecanismo de seleção proporcionado por esta técnica está relacionado à diferença de densidade entre células íntegras e lesadas (Morrell et al., 2010a).

Foi observada uma redução de algumas patologias espermáticas após a centrifugação em gradiente de densidade, no entanto, o aumento significativo de cabeça isolada normal pode ter levado à ausência de diferença estatística no total

de células normais. Em um estudo de Morrell et al. (2010a) a patologia cabeça isolada normal não sofreu influência da centrifugação, e os autores relacionaram este fato à uma possível semelhança de densidade destas à das células normais. No entanto, no presente experimento, o aumento desta patologia após a centrifugação sugere que não só estas células atravessam o gradiente, como pode haver células que se destaquem de suas caudas durante o processo, em decorrência do estresse mecânico.

Morrell et al. (2010b), trabalhando com Androcoll-E<sup>®</sup> e Ramires-Neto et al. (2012) com EquiPure<sup>™</sup>, também não encontraram diferença significativa na viabilidade após a centrifugação. Entretanto, após a refrigeração por 24 horas das amostras centrifugadas em gradiente foi evidenciada uma maior proporção de células viáveis, quando comparada ao controle (Morrell et al., 2010b – 69,2% vs. 58,8%,  $P < 0,001$ ; Ramires-Neto et al., 2012 – 67,7% vs. 30%;  $P < 0,05$ ). No entanto, Morrell et al. (2010b) fizeram a lavagem do sêmen que não foi centrifugado em gradiente, enquanto que Ramires-Neto et al. (2012) efetuaram apenas sua diluição. Estes resultados levam a crer que, embora a seleção de viáveis não tenha sido perceptível logo após a passagem pelo gradiente, pode ter havido a seleção de alguma característica não avaliada que resulta em maior viabilidade após o armazenamento do sêmen sob a refrigeração.

A seleção de espermatozoides com alta atividade mitocondrial (DAB I;  $P < 0,05$ ) e a redução de células com inatividade mitocondrial (DAB IV;  $P < 0,05$ ) pode ser um dos fatores responsáveis pelo aumento da motilidade após a centrifugação em gradiente de única camada, pois a mitocôndria possui a função de gerar ATP na célula espermática (Koopers et al., 2008). Macías-García et al. (2009) observaram aumento de células com alto (42,2% vs. 8,9%;  $P < 0,05$ ) e redução de células com

baixo potencial de membrana mitocondrial (15,6% vs. 58,9 %;  $P < 0,05$ ) após a centrifugação do sêmen congelado em Androcoll-E<sup>®</sup>. No entanto, no experimento de Macías-García et al. (2012), este efeito não foi significativo ( $P > 0,05$ ) após a centrifugação do sêmen refrigerado, no mesmo gradiente.

Apesar da menor motilidade e vigor do sêmen pós-descongelação, quando acrescido de 7 mM de GSH, a taxa de recuperação espermática, entre os tratamentos, não diferiu ( $P > 0,05$ ). Esperava-se obter uma menor viabilidade espermática e atividade mitocondrial após a descongelação, o que não ocorreu, fato que pode, possivelmente, justificar a ausência de diferença na taxa de recuperação.

Na comparação entre os gradientes constatou-se uma maior motilidade ( $P > 0,05$ ) nas amostras centrifugadas com EquiPure<sup>™</sup>, nos tratamentos controle e GSH 3. No entanto, o Androcoll-E<sup>®</sup> apresentou maior proporção de células com alta atividade mitocondrial ( $P > 0,05$ ), no grupo controle. Pelo conjunto de variáveis analisadas, não houve superioridade, quanto à seleção espermática, entre os gradientes utilizados.

Houve indução da lipoperoxidação pela centrifugação em gradiente de única camada. A concentração de TBARS duplicou na maioria dos tratamentos, chegando a triplicar no tratamento GSH 7, após centrifugação no EquiPure<sup>™</sup>. Nenhuma das concentrações testadas de GSH mostrou-se eficaz em proteger contra a lipoperoxidação induzida pelo estresse causado pela centrifugação. Pode-se supor que após o processo de centrifugação haja uma nova redução da capacidade antioxidante, pois os espermatozoides são separados do diluente em que se encontravam. Além disso, houve aumento significativo de espermatozoides com cabeça isolada normal, que apresentou correlação positiva com a lipoperoxidação.

A retenção da gota citoplasmática têm sido associada ao aumento da produção de ROS (Aziz et al., 2004; Ball et al., 2001; Nichi et al., 2007), contudo, quando da presença da gota citoplasmática proximal, em espermatozoides da cauda do epidídimo de bovinos, esta mostrou-se positivamente correlacionada ( $r=0,42$ ;  $P<0,05$ ) à lipoperoxidação, ao contrário da gota citoplasmática distal ( $r=-0,63$ ;  $P<0,05$ ; Nichi et al., 2007). No presente experimento observou-se redução de espermatozoides com gota citoplasmática proximal após a centrifugação, sendo correlacionada positivamente com a lipoperoxidação apenas após a centrifugação em Androcoll-E<sup>®</sup>, enquanto a gota citoplasmática distal correlacionou-se positivamente após passagem pelo EquiPure<sup>TM</sup>, provavelmente por esta ser considerada patológica no ejaculado, diferindo do sêmen epididimário (Barth e Oko, 1989). A baixa frequência de gota citoplasmática do presente experimento, comparada ao encontrado nos estudos citados, pode ter levado a uma redução de sua influência sobre a lipoperoxidação.

Macías-García et al. (2012) observaram uma maior proporção de espermatozoides produzindo o ânion superóxido (42,4% vs. 21,9%;  $P<0,05$ ) após submeter o sêmen equino refrigerado à centrifugação em Androcoll-E<sup>®</sup>. Uma hipótese levantada pelos autores foi a ocorrência da seleção de uma subpopulação de espermatozoides vivos e com maior atividade metabólica, que seriam mais competentes em produzir níveis fisiológicos de ROS, mas sem qualquer efeito deletério. No entanto, os níveis de ROS produzidos no presente experimento foram suficientes para aumentar a lipoperoxidação, o que pode ter sido resultado da produção excessiva de ROS e/ou redução da capacidade antioxidante, gerando um estresse oxidativo exacerbado (Baumber et al., 2000; Neild et al., 2005, 2003).

Células com cabeça isolada normal, à análise de viabilidade/*status* acrossomal, com a coloração *trypan blue* / Giemsa, apresentam-se como células mortas. Apesar de no presente experimento não ter sido observada uma correlação entre viabilidade e lipoperoxidação, Ortega-Ferrusola et al. (2009) obtiveram uma correlação inversamente proporcional, de alta intensidade ( $r=-0,79$ ;  $P<0,001$ ), o que pode sugerir que a presença de células mortas induz o aumento da lipoperoxidação.

Já Ortega-Ferrusola et al. (2011) não encontraram diferença significativa para os níveis de lipoperoxidação, ao centrifugarem o sêmen equino fresco no gradiente Androcoll-E<sup>®</sup>, avaliado através da técnica de BODIPY C<sub>11</sub>. Morrell et al. (2013) observaram redução do número de espermatozoides vivos (16% vs. 23%;  $P<0,01$ ) e mortos (30% vs. 32%;  $P<0,01$ ) produzindo ânion superóxido e de gametas vivos produzindo peróxido de hidrogênio (0,3% vs. 1,0%;  $P<0,01$ ), após centrifugação do sêmen equino refrigerado em Androcoll-E<sup>®</sup>, o que levaria à uma redução da lipoperoxidação.

No que se refere à fertilidade a campo, estudos não observaram diferença significativa quanto a taxa de prenhez do sêmen submetido ou não à centrifugação em gradiente de única camada, apesar da melhora de sua qualidade (Cerny et al., 2012), mesmo para garanhões “problema” (Morrell et al., 2011b). Frente a esses resultados pode-se supor que, o aumento da lipoperoxidação após a passagem dos espermatozoides pelos gradientes, conforme detectado no presente trabalho, parece não ter efeito negativo sobre a fertilidade *in vivo*.

Em resumo, a concentração de 3 mM de GSH apresentou efeito protetor contra a lipoperoxidação durante a criopreservação e, maior motilidade pós-descongelção, quando comparada às demais concentrações testadas. No entanto, esta dose ainda não pode ser considerada ideal. Para se atingir uma máxima

proteção, sem que sejam afetados os níveis fisiológicos de ROS, novos estudos são necessários. Além disso, pesquisas precisam ser conduzidas para avaliar o efeito da GSH frente a diferentes composições de diluentes, bem como sua associação com a glutathione peroxidase. A passagem dos espermatozoides pelo gradiente de única camada induziu a lipoperoxidação, e a GSH não se mostrou eficaz contra os efeitos deste estresse, possivelmente pela redução da sua capacidade antioxidante, ao serem as células separadas do diluente durante a centrifugação.

## **5 Conclusões**

Nas concentrações de 3 mM e 5 mM, a glutathione reduzida apresentou efeito antioxidante após a descongelação, enquanto a de 7 mM mostrou-se tóxica para o sêmen equino. A centrifugação em gradiente de única camada induziu à lipoperoxidação do sêmen, não sendo observada ação antioxidante da glutathione reduzida durante este processo.

## **Agradecimento**

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

## **Referências**

- Agarwal, A., Saleh, R.A., Bedaiwy, M.A., 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil. Steril.* 79, 829-843.
- Armstrong, J.S., Rajasekaran, M., Chamulitrat, W., Gatti, P., Hellstrom, W.J., Sikka, S.C., 1999. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human

spermatozoa movement and energy metabolism. *Free Radical Bio. Med.* 26, 869-880.

Aziz, N., Saleh, R.A., Sharma, R.K., Lewis-Jones, I., Esfandiari, N., Thomas, A.J., Agarwal, A., 2004. Novel association between sperm reactive oxygen species production, sperm morphological defects, and the sperm deformity index. *Fertil. Steril.* 2, 349-354.

Ball, B.A., Vo, A.T., Baumber, J., 2001. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. *Am. J. Vet. Res.* 62, 508-515.

Barth, A.D., Oko, R.J., 1989. *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. 1. ed. Iowa State University Press, Ames, 285p.

Baumber, J., Ball, B.A., Gravance, C.G., Medina, V., Davies-Morel, M.C.G., 2000. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *J. Androl.* 21, 895-902.

Baumber, J., Ball, B.A., Linfor, J.J., Meyers, S.A., 2003a. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *J. Androl.* 24, 621-628.

Baumber, J., Ball, B.A., Linfor, J.J., 2005. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers antioxidants. *Am. J. Vet. Res.* 66, 772-229.

Baumber, J., Sabeur, K., Vo, A., Ball, B.A., 2003b. Reactive Oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. *Theriogenology* 60, 1239-1247.



- Bilodeau, J.F. Blanchette, S., Gagnon, C., Sirard, M.A., 2001. Thiols prevent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. *Theriogenology* 56, 275-286.
- Burnaugh, L., Sabeur, K., Ball, B.A., 2007. Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium. *Theriogenology*, 67, 580-589.
- Câmara, D.R., Silva, S.V., Almeida, F.C., Nunes, J.F., Guerra, M.M.P., 2011. Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen. *Theriogenology* 76, 342-350.
- Cerny, K.L., Hughes, S., Campos, J.R., Coleman, R.J., Troedsson, M.H.T., Squires, E.L., 2012. Fertility of mares inseminated with frozen-thawed semen processed by single layer centrifugation through a colloid. *J. Equine Vet. Sci.* 32, 289-291.
- Crespo, F., Gosálvez, J., Gutiérrez-Cepeda, L., Serres, C., Johnston, S.D., 2013. Colloidal centrifugation of stallion semen results in a reduced rate of sperm DNA fragmentation. *Reprod. Domest. Anim.* 48, e23-e25.
- Didion, B.A., Dorbinski, J.R., Giles, J.R., Graves, C.N., 1989. Staining procedure to detect viability and true acrosome reaction in spermatozoa of various species. *Gamete Res.* 22, 51-57.
- Ferreira, A.L.A., Matsubara, L.S., 1997. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Ass. Med. Brasil* 43, 61-68.
- Gadea, J., García-Vasquez, F., Matás, C., Gardón, J.C., Cánovas, S., Gumbao, D., 2005. Cooling and freezing of boar spermatozoa: supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function. *J. Androl.* 26, 396-404.
- Gadea, J., Gumbao, D., Cánovas, S., García-Vásquez, F.A., Grullón, L.A., Gardón, J.C., 2007. Supplementation of the dilution medium after thawing with reduced

glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of frozen-thawed bull spermatozoa. *Int. J. Androl.* 31, 40-49.

Gadea, J., Sellés, E., Marco, M.A., Coy, P., Matás, C., Romar, R., Ruiz, S., 2004. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation: effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology* 62, 690-701.

Hammerstedt, R.H., Graham, J.K., Nolan, J.P., 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *J. Androl.* 11, 73-88.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 1986. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* 246, 501-514.

Hrudka, F., 1987. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. *Int. J. Androl.* 19, 809-828.

Johannisson, A., Morrell, J.M., Thorén, J., Jossan, M., Dalin, A-M., Rodriguez-Martinez, H., 2009. Colloidal centrifugation with Androcoll-E<sup>TM</sup> prolongs stallion sperm motility, viability and chromatin integrity. *Anim. Reprod. Sci.* 116, 119-128.

Kankofer, M., Kolm, G., Aurich, J., Aurich, C., 2005. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5 °C. *Theriogenology* 63, 1354-1365.

Koopers, A.J., De Iuliis, G.N., Finnie, J.M., McLaughlin, E.A., Aitken, J., 2008. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93, 3199-3207.

- Macías-García, B., González-Fernández, L., Gallardo-Bolaños, J.M., Peña, F.J., Johannisson, A., Morrell, J.M., 2012. Androcoll-E large selects a subset of live stallion spermatozoa capable of producing ROS. *Anim. Reprod. Sci.* 132, 74-82.
- Macías-García, B., González-Fernández, L., Morrell, J.M., Ortega-Ferrusola, C., Tapia, J.A., Rodríguez-Martínez, H., Peña, F.J., 2009. Single-layer centrifugation through colloid positively modifies the sperm subpopulation structure of frozen-thawed stallion spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.* 44, 523-526.
- Mancill, S.S., Love, C.C., Brinsko, S.P., Edmond, A.J., Foster, M.L., Teague, S.R., Waite, J.A., Varner, D.D., 2010. Effect of density gradient centrifugation on cryopreservation of equine spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 121S, S208-S209.
- Meister, A., 1994. Glutathione, ascorbate, and cellular protection. *Cancer Res.* 54, 1969-1975.
- Morrell, J.M., Johannisson, A., Dalin, A-M., Rodríguez-Martínez, H., 2009. Single-layer centrifugation with Androcoll-E can be scaled up to allow large volumes of stallion ejaculate to be processed easily. *Theriogenology* 72, 879-884.
- Morrell, J.M., Macias-Garcia, B., Pena, F.J., Johannisson, A., 2011a. Processing stored stallion doses by single layer centrifugation. *Theriogenology* 76, 1424-1432.
- Morrell, J.M., Mari, G., Kútvölgyi, G., Meurling, S., Mislei, B., Lacono, E., Rodríguez-Martínez, H., 2011b. Pregnancies following artificial insemination with spermatozoa from problem stallion ejaculates processed by single layer centrifugation with Androcoll-E. *Reprod. Domest. Anim.* 46, 642-645.
- Morrell, J.M., Rodríguez-Martínez, H., Johannisson, A., 2010a. A single layer centrifugation of stallion spermatozoa consistently selects the most robust spermatozoa from the rest of the ejaculate in a large sample size. *Equine Vet. J.* 42, 579-585.

- Morrell, J.M., Rodriguez-Martinez, H., Johannisson, A., 2010b. Single layer centrifugation of stallion spermatozoa improves sperm quality compared with sperm washing. *RBM Online*. 21, 429-436.
- Morrell, J.M., Winblad, C., Georgakas, A., Stuhmann, G., Humblot, P., 2013. Reactive oxygen species in stallion semen can be affected by season and colloid centrifugation. *Anim. Reprod. Sci.* 140, 62-69.
- Neild, D.M., Brouwers, J.F.H.M., Colenbrander, B., Agüero, A., Gadella, B.M., 2005. Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 72, 230-238.
- Neild, D.M., Gadella, B.M., Chaves, M.G., Miragaya, M.H., Colembrander, B., Agüero, A., 2003. Membrane changes during different stages of a freeze-thaw protocol for equine semen cryopreservation. *Theriogenology* 59, 1693-1705.
- Nichi, M., Goovaerts, I.G.F., Cortada, C.N.M., Barnabe, V.H., De-Clercq, J.B.P., Bols, P.E.J., 2007. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on *in vitro* fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymis stored at 4 and 34 °C. *Theriogenology* 67, 334-340.
- Nunes, D.B., Zorzatto, J.R., Costa e Silva, E.V., Zúccari, C.E.S.N., 2008. Efficiency of short-term storage of equine semen in a simple-design cooling system. *Anim. Reprod. Sci.* 104, 434-439.
- Ortega-Ferrusola, C., González Fernández, L., Morrell, J.M., Salazar Sandoval, C., Macías García, B., Rodríguez-Martinez, H., Tapia, J.A., Peña, F.J., 2009. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C<sub>11</sub>, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. *Reproduction* 138, 55-63.

- Ortega-Ferrusola, C., Johannisson, A., Vega, F.J.P., Tapia, J.A., Rodriguez-Martinez, H., Dalin, A.M., Morrell, J.M., 2011. Effect of different extenders and seminal plasma on the susceptibility of equine spermatozoa to lipid peroxidation after single-layer centrifugation, through Androcoll-E. J. Equine Vet. Sci. 31, 411-416.
- Pommer, A.C., Rutlant, J., Meyers, S.A., 2002. The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function. Theriogenology 58, 1373-1384.
- Ramires-Neto, C., Monteiro, G.A., Delfiol, D.J.Z., Farras, M.C., Maziero, R.R.D., Hartwing, F.P., Papa, F.O., Alvarenga, M.A., 2012. Effect of different methods for sperm selection on cooled stallion semen. J. Equine Vet. Sci. 32, 509.
- Sakanaka, S., Tachibana, Y., Ishihara, N., Juneja, L.R., 2004. Antioxidant activity of egg-yolk protein hidrolysates in linoleic acid oxidation system. Food Chem. 86, 99-103.
- SAS – Statistical Analysis System. SAS/STAT software, Version 8.02, Carry: 001.
- Silva, S.V., Soares, A.T., Batista, A.M., Almeida, F.C., Nunes, J.F., Peixoto, C.A., Guerra, M.M.P., 2011. *In vitro* and *in vivo* evaluation of ram sperm frozen in tris egg-yolk and supplemented with superoxide dismutase and reduced glutathione. Reprod. Domest. Anim. 46, 874-881.
- Sinha, M.P., Sinha, A.K., Singh, B.K., Prasad, R.L., 1996. The effect of glutathione on the motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. Anim. Reprod. Sci. 41, 237-243.
- Stoll, A., Love, C.C., Ball, B.A., 2010. Use of a single layer density centrifugation to reduce the number of DNA-damage sperm and enhance sperm quality in cryopreserved-thawed stallion semen. Anim. Reprod. Sci. 121S, S163-S164.

Stoll, A., Love, C.C., Ball, B.A., 2013. Use of a single-layer density centrifugation method enhances sperm quality in cryopreserved-thawed equine spermatozoa. *J. Eq. Vet. Sci.* 33, 547-551.