

Espermatozoides caprinos criopreservados em meio à base de leite desnatado acrescido de glutathione reduzida

Goat spermatozoa after freezing in skimmed-milk extender supplemented with reduced glutathione

Adriana Trindade Soares^{I,II} Sildivane Valcácia Silva^I Felipe Costa Almeida^I
Paula Fernanda Barbosa de Araújo Lemos^{II} José Ferreira Nunes^{III} Christina Alves Peixoto^{IV}
Maria Madalena Pessoa Guerra^{I*}

RESUMO

Visando avaliar o efeito da adição de glutathione reduzida (GSH) ao diluente de congelamento de sêmen caprino à base de leite desnatado, utilizou-se sêmen de cinco reprodutores Boer. Após colheita e avaliação, procedeu-se à formação do pool dos ejaculados e diluição em leite desnatado e glicerol 7%, acrescido de antioxidantes: G1) Controle; G2) GSH 2mM mL⁻¹; G3) GSH 5mM mL⁻¹ e G4) GSH 7mM mL⁻¹. As amostras foram congeladas em palhetas (0,25mL) e armazenadas a -196°C. Após descongelamento, avaliou-se a integridade de membrana plasmática (iMP) e acrossomal (iAc), potencial de membrana mitocondrial (PMM), cinética e ultraestrutura. Os grupos Controle e GSH (2, 5 e 7mM mL⁻¹) não diferiram (P>0,05) em iMP, iAc, PMM e cinética. Na análise ultraestrutural, os percentuais de membrana plasmática (cabeça e cauda) e acrossoma íntegros não diferiram (P>0,05) entre grupos. Todavia, o grupo Controle apresentou maior porcentual (P<0,05) de gametas com axonema íntegros do que os de GSH (2, 5 e 7mM mL⁻¹). Maior porcentagem (P<0,05) de espermatozoides com mitocôndrias íntegras foi observada no grupo Controle do que nos de GSH (5 e 7 mM mL⁻¹). Conclui-se que a adição de GSH (2, 5 e 7mM mL⁻¹) em diluente de congelamento de sêmen caprino, à base de leite desnatado, não preserva a integridade dos espermatozoides.

Palavras-chave: antioxidantes, sêmen, viabilidade espermática.

ABSTRACT

Aiming to evaluate *in vitro* effect of different concentrations of glutathione reduced (GSH) in skimmed-milk and glycerol 7% it was used semen from five Boer bucks. After collect and evaluation, a pool of samples was diluted in

skimmed-milk and glycerol 7% plus antioxidant: G1) Control; G2) GSH 2mM mL⁻¹; G3) GSH 5mM mL⁻¹ and G4) GSH 7mM mL⁻¹. Samples were frozen in straws (0.25mL) and stored at -196°C. After thawing, samples were subjected to integrity of the plasma membrane (iMP) and acrosomal (iAc), mitochondrial membrane potential (PMM), kinematic and ultrastructure analysis. Control and GSH (2, 5 and 7mM mL⁻¹) groups did not differ (P>0.05) in iMP, iAc, PMM and kinematic parameters. In the ultrastructural analysis, percentages of acrosome and plasma membrane (tail and head region) intact did not differ (P>0.05) between groups. However, Control group had higher percentage (P<0.05) of gametes with intact axonemes than those of GSH (2, 5 and 7mM mL⁻¹) groups. Higher percentage (P<0.05) of sperms with intact mitochondrias were observed on Control group than those of GSH (5 and 7mM mL⁻¹). It can be concluded that the GSH (2, 5 and 7mM mL⁻¹) addition in skimmed-milk diluent to freeze goat semen did not preserve sperm integrity.

Key words: antioxidants, semen, sperm viability.

INTRODUÇÃO

A redução da fertilidade, associada à inseminação artificial com sêmen congelado, é atribuída à ocorrência de danos espermáticos durante a congelamento e descongelamento, causando alterações ultraestruturais, bioquímicas e funcionais que reduzem a viabilidade espermática. Estudos têm relatado que muitos mecanismos de defesa antioxidante estão envolvidos nos sistemas biológicos e que o equilíbrio

^ILaboratório de Andrologia, Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), 52171-900, Recife, PE, Brasil. E-mail: mpguerra@dmv.ufrpe.br. Autor para correspondência.

^{II}Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba (EMEPA), João Pessoa, PB, Brasil.

^{III}Laboratório de Tecnologia do Sêmen, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, CE, Brasil.

^{IV}Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), Recife, PE, Brasil.

entre os benefícios e danos de ROS e antioxidantes, *in vivo* e *in vitro*, é necessário para o funcionamento reprodutivo normal. Dessa forma, durante as manipulações espermáticas em laboratório, especialmente na ausência do plasma seminal, os antioxidantes celulares são importantes em preservar a motilidade e a habilidade dos espermatozoides de sofrerem capacitação e reação do acrossoma (GUERRA et al., 2004).

O processo de criopreservação estabelece significativa redução da glutathiona no sêmen de diversas espécies (GADEA et al., 2004, GADEA et al., 2008). Porém, o efeito deletério deste processo pode ser minimizado, em parte, pela adição de GSH exógena, pois as células utilizam GSH do sistema thioredox para reverter o estresse oxidativo (GADEA et al., 2005b). Nesse sentido, tem-se adicionado GSH ao diluente de congelação ou descongelação do sêmen de pequenos ruminantes (SINHA et al., 1996; GARDÓN et al., 2003), bovino (GADEA et al., 2008), suíno (GADEA et al., 2005a, 2005b). Ainda pouco se sabe sobre o metabolismo da GSH no sêmen, e ainda permanecem algumas questões a serem esclarecidas a respeito de sua qualidade espermática e sua capacidade fecundante pós-descongelação (GADEA, et al., 2005b).

O presente trabalho objetivou avaliar *in vitro* o efeito da adição de GSH ao diluente de congelação de sêmen caprino, à base de leite desnatado e glicerol 7% por meio da avaliação da cinética espermática, integridade da membrana plasmática, integridade de acrossoma, atividade mitocondrial e análise ultraestrutural.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados cinco reprodutores caprinos da raça Boer, idade variando de 24 a 36 meses. Os animais foram submetidos a regime intensivo, alimentados com 400g dia⁻¹ de concentrado comercial, além de capim elefante (*Pennisetum purpureum*), sal mineral e água *ad libitum*. As colheitas de sêmen foram realizadas com vagina artificial. Foram obtidos seis ejaculados por reprodutor, obedecendo à frequência de três colheitas de sêmen por semana, correspondendo a 30 amostras de sêmen.

Após colheita, o sêmen foi submetido à avaliação, selecionando-se aqueles com motilidade $\geq 70,0\%$ e vigor ≥ 3 . Em seguida, formou-se o *pool* de ejaculados, o qual foi centrifugado duas vezes (2500g; 10 minutos) em tampão Tris, na proporção de 1:9 (v:v; sêmen:solução de lavagem). A seguir, o *pool* foi diluído em meio à base de leite desnatado e glicerol (7%), na concentração de 240×10^6 espermatozoides mL⁻¹,

acrescido de antioxidantes: G1) Controle (sem antioxidante); G2) GSH 2mM mL⁻¹; G3) GSH 5mM mL⁻¹; e G4) GSH 7mM mL⁻¹. Após diluição, as amostras foram acondicionadas em palhetas (0,25mL) e submetidas à refrigeração e congelação em sistema automatizado (modelo TK 3000® - TK Tecnologia em Congelação LTDA, Uberaba, Brasil) e, na curva de congelação rápida, após atingir a temperatura de -120°C, as palhetas foram armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C).

Após descongelação (37°C, por 30 segundos), alíquotas de sêmen de cada grupo foram submetidas às análises de cinética em sistema computadorizado (CASA; Sperm Class Analyzer, Microoptics, S.L. Version 3.2.0 Barcelona, Spain), estrutura em microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss, Göttingen, Germany) e ultraestrutura espermática em microscópio eletrônico de transmissão (FEI Company, Eindhoven, Netherland). Para análise da cinética espermática, utilizou-se 10µL da amostra de sêmen em câmara de Makler® (37°C), examinada em microscópio de contraste de fase (100x) acoplado ao sistema CASA, no qual se observaram os parâmetros de motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade curvilínea (VCL, µm s⁻¹), velocidade progressiva (VSL, µm s⁻¹), velocidade de trajeto (VAP, µm s⁻¹), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %), oscilação (WOB, %), amplitude de deslocamento da cabeça (ALH, µm), frequência do batimento de flagelo (BCF, Hz), segundo VERSTEGEN et al. (2002).

Para análise da estrutura por sondas fluorescentes, avaliou-se a integridade da membrana plasmática pelo método de coloração dupla com Diacetato de Carboxifluoresceína (DCF) e Iodeto de Propídio (IP), segundo COLETO et al. (2002). Um total de 200 espermatozoides foi avaliado em aumento de 400x, usando filtro de emissão DBP 580-630nm e excitação DBP 485/20nm, e classificados como membrana intacta quando corados em verde ou membrana danificada quando corados em vermelho. Para análise de integridade do acrossoma, usou-se isocianato de fluoresceína conjugado a *Peanut agglutinin* (FITC-PNA; ROTH et al., 1998). Foram avaliados 200 espermatozoides por lâmina, com aumento de 1000x, sob óleo de imersão, usando filtro de emissão LP 515nm e BP 450-490nm para excitação. Os gametas foram classificados como portadores de acrossomas intactos, quando apresentaram a região acrossomal corada com fluorescência verde, ou acrossoma reagido, quando apresentavam uma faixa verde fluorescente na região equatorial da cabeça espermática ou não apresentavam fluorescência verde em toda a cabeça. Para análise de potencial da

membrana mitocondrial (PMM), utilizou-se fluorocromo catiônico lipofílico JC-1 (GUTHRIE & WELCH, 2006). Um total de 200 espermatozoides foi avaliado com aumento de 1000x sob óleo de imersão usando filtro de emissão LP 515nm e BP 450-490nm para excitação. As células coradas em laranja foram classificadas com alto PMM, enquanto aquelas coradas em verde foram classificadas com baixo PMM.

Para análise da ultraestrutura espermática, foram usadas amostras de sêmen *in natura* e congeladas/descongeladas, as quais foram centrifugadas três vezes (800g; 5 minutos) em solução tampão (PBS) e fixadas *overnight* em solução de Glutaraldeído, Paraformaldeído e tampão Cacodilato de Sódio, seguindo protocolo de SARAIVA et al. (2009).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o procedimento PROC GLM do programa SAS (2001). Os dados das variáveis estudadas foram submetidos à análise de variância, obedecendo a um delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se o teste F para comparação dos quadrados médios dos fatores testados e as médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros da cinética espermática não diferiram ($P > 0,05$) entre os grupos estudados. Obteve-se média±desvio padrão, respectivamente, para os grupos Controle e GSH 2, 5 e 7mM de 77,22±18,56, 84,98±10,16, 73,11±21,32 e 64,13±20,36 de MT;

26,26±12,21, 27,46±8,06, 19,00±10,33 e 21,15±10,32 de MP; 47,28±6,30; 48,53±6,32; 42,86±6,55 e 48,40±5,73 de LIN; 74,00±1,46, 73,76±4,42, 64,61±17,65 e 74,78±1,13 de STR; 63,70±8,11, 65,75±6,95, 60,01±6,95 e 64,61±7,59 de WOB; 35,98±5,83, 37,06±7,55, 31,76±6,45 e 34,70±5,45 de VSL e 48,50±7,66, 50,25±9,90, 42,73±11,09 e 46,40±7,32 de VAP.

Os resultados de MT e MP evidenciam que, ao se aumentar a concentração de GSH, reduzem-se os percentuais de gametas vivos e com MP, ratificando o resultado da análise de integridade da membrana plasmática, realizada por sonda fluorescente (Tabela 1). Os parâmetros de MP, LIN, STR, WOB, VSL, VAP e alto PMM (Tabela 1) mostram que a adição de GSH 5 mM mL⁻¹ determinou valores menores do que com 2 e 7 mM mL⁻¹, mostrando relação entre PMM e cinética espermática. O baixo percentual de espermatozoides com MP pode ser atribuído à congelação, que causa danos subletais e reduzem a qualidade do movimento espermático (PESCH & BERGMANN, 2006), possivelmente devido à exposição espermática ao O₂, resultando em aumento da produção de ROS. Este fato evidencia que a adição de GSH, nas concentrações usadas, não foi adequada para inativar ROS como O₂⁻ e OH⁻.

A porcentagem de espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal íntegras, assim como com alto PMM (Tabela 1), não diferiu entre os grupos Controle e tratados com GSH (2, 5 e 7mM mL⁻¹). No entanto, constatou-se maior percentual de gametas com membrana plasmática íntegra nas amostras do

Tabela 1 - Resultados (média ± desvio padrão) das análises por fluorescência (iMP, iAc e aPMM) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) (iMCA, iAc, iMC, AX e MIT) de espermatozoides obtidos de reprodutores caprinos da raça Bôer, *in natura* e criopreservados em diluente à base de leite desnatado e glicerol 7% acrescido de Glutaciona reduzida (GSH) em diferentes concentrações.

Parâmetros Espermáticos	Sêmen <i>in natura</i>	-----Grupos Experimentais-----			
		Controle	GSH 2mM mL ⁻¹	GSH 5mM mL ⁻¹	GSH 7mM mL ⁻¹
-----Análise por Fluorescência-----					
iMP (%)	-	39,55±8,91	43,31±9,91	39,14±9,80	36,09±7,66
iAc (%)	-	38,76±12,23	35,05±11,90	38,08±12,95	46,21±10,71
aPMM (%)	-	47,45±9,30	47,51±9,04	38,41±9,48	40,21±3,61
-----Análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão-----					
iMCA (%)	39,63±5,34 ^a	28,28±4,52 ^b	35,25±5,34 ^b	26,51±2,50 ^b	26,13±3,38 ^b
iAc (%)	65,33±11,18 ^a	33,66±5,27 ^b	27,40±3,20 ^b	30,11±1,64 ^b	31,38±2,35 ^b
iMC (%)	64,35±7,76 ^a	36,31±4,38 ^b	30,75±2,52 ^b	30,31±2,98 ^b	29,58±2,56 ^b
AX (%)	80,33±4,33 ^a	55,66±7,00 ^b	43,90±5,94 ^c	44,18±5,79 ^c	33,96±4,34 ^d
MIT (%)	72,82±11,33 ^a	61,53±5,81 ^{ab}	50,86±3,94 ^b	30,58±1,49 ^c	28,43±2,19 ^c

iMP: membrana plasmática íntegra; iAc: acrossoma íntegro; aPMM: alto potencial de membrana mitocondrial; iMCA: membrana plasmática íntegra na região da cabeça do espermatozoide; iMC: membrana plasmática íntegra na região da cauda do espermatozoide; AX: axonema íntegro; MIT: mitocôndrias íntegras. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($P < 0,05$).

GSH 2mM mL⁻¹, corroborando as ressalvas de BILODEAU et al. (2001), enfatizando que, maiores concentrações de GSH determinam percentuais menores de gametas com membrana plasmática intacta, provavelmente devido ao fato de concentrações elevadas de GSH causarem danos aos espermatozoides bovinos, por alterar a osmolaridade celular, fragilizar a membrana plasmática e causar ruptura nessa estrutura.

Apesar do percentual de gametas com acrossoma íntegro não haver diferido entre grupos, verificou-se que concentrações mais elevadas deste antioxidante foram benéficas à integridade desta estrutura celular. Sabe-se que a GSH remove o H₂O₂, inibidor da tirosina fosfatase (enzima envolvida na fosforilação da tirosina) (HECHT & ZICK, 1992), impedindo o início da capacitação dos espermatozoides, conforme evidenciado por GADEA et al. (2005b) quando GSH 1 e 5mM foi adicionada ao meio de descongelamento de sêmen suíno refletindo, em baixa porcentagem de espermatozoides capacitados, comparado ao grupo controle. Dessa forma, esperava-se melhor resultado ao utilizar GSH 7mM mL⁻¹. Todavia, a análise da membrana plasmática mostrou o inverso, deixando dúvida quanto à melhor concentração de GSH a ser usada em diluidor de congelamento de sêmen caprino, uma vez que os dois parâmetros se referem à integridade de membranas que participam do processo de capacitação espermática. Além disso, esses resultados contradizem os relatos de SINHA et al. (1996), que, ao congelarem espermatozoides caprinos em diluente à base de Tris, glicerol e GSH (2 e 5mM), observaram maior motilidade, integridade de acrossoma e taxas de concepção ao usarem 5mM de GSH, sugerindo proteção às membranas espermáticas da peroxidação lipídica.

Neste estudo, observou-se que 2, 5 e 7mM mL⁻¹ de glutathiona não preservou o PMM dos espermatozoides congelados. Todavia, na concentração de 2mM mL⁻¹ obteve-se percentual maior do que em 5 e 7mM mL⁻¹. O percentual médio obtido no grupo Controle (47,45±9,30%) foi semelhante aos 40,33% relatados por BATISTA et al. (2009), em espermatozoides caprinos da raça Boer. MARCO-JIMÉNEZ et al. (2006) constataram que o processo de congelamento/descongelamento de espermatozoides caprinos da raça Murciano-granadina determinou considerável redução do número de células com alto PMM (59,00% *in natura* vs 27,70% congelado), avaliados pelo JC-1. No entanto, o percentual de gametas com alto PMM observado por estes autores foi inferior àquele obtido neste estudo, sugerindo variação entre raças, diluente ou método de congelamento.

Neste trabalho foi hipotetizado que a adição de GSH ao meio de congelamento protegeria o espermatozoide durante a criopreservação. No entanto, nas concentrações utilizadas, não se observou melhora significativa na qualidade destes gametas, pós-descongelamento. Esse fato pode ser atribuído à presença da caseína, antioxidante natural encontrado no leite, conforme foi ressaltado por FOOTE et al. (2002), os quais observaram que a adição dos antioxidantes glutathiona, superóxido dismutase, ácido ascórbico, hipotaurina, tempo e tempol ao diluente à base de leite e glicerol não preservaram a motilidade e a fertilidade do sêmen bovino. Entretanto, KHALIFA & SAIDY (2006) evidenciaram significativo efeito da adição de vários antioxidantes (EDTA, catalase bovina, GSH, piruvato de sódio) em meio de diluição de sêmen quimicamente definido sobre a motilidade progressiva de espermatozoides caprinos submetidos à criopreservação sem a remoção do plasma seminal por centrifugação. Isso pode ser explicado pelo fato de que, meios quimicamente definidos eliminam os efeitos adversos das secreções da glândula bulbouretral sobre a viabilidade espermática estocada em meio contendo leite (SIAS et al., 2005). Além disso, a centrifugação é um método que consome tempo e causa danos às células espermáticas (VILLEMURE et al., 2003). Todavia, em virtude de diferenças na composição das membranas plasmáticas de espermatozoides caprinos e bovinos (PURDY, 2006), acreditava-se que GSH no diluente de congelamento do sêmen caprino mantivesse a integridade de suas membranas.

Observa-se que a congelamento do sêmen caprino não causou hiperativação das células espermáticas nas amostras dos grupos Controle e GSH (2, 5 e 7mM mL⁻¹), uma vez que não se observou VCL>250,0mm s⁻¹, VSL≤100,0mm 1⁻¹, LIN≤30% e ALHmax≥9,0mm s⁻¹ (MORTIMER & MAXWELL, 1999). No entanto, com base nos resultados das sondas fluorescentes, esperava-se que esses gametas apresentassem sinais de hiperativação, devido à ocorrência de danos na membrana plasmática causados pela congelamento (CHECK & CHECK, 1991), resultando no aumento da quantidade de espermatozoides capacitados (MAXWELL & WATSON, 1996).

Os dados ultraestruturais (Tabela 1) da membrana plasmática (cabeça e cauda) e do acrossoma não diferiram (P>0,05) entre grupos, mas foram inferiores (P<0,05) aos do sêmen *in natura* (Figura 1A), que também apresentaram células com rompimento e ondulação da membrana plasmática na região da cabeça (Figura 1B). Todavia, as amostras de sêmen *in natura* e do grupo Controle apresentaram maior percentual (P<0,05) de gametas com axonema

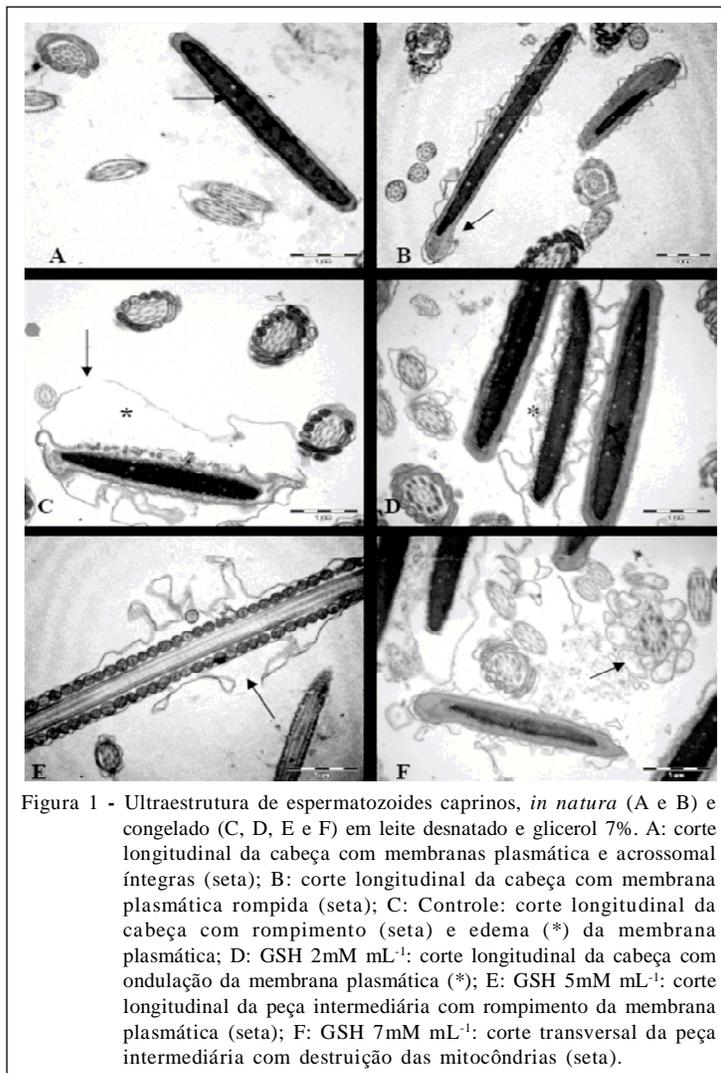


Figura 1 - Ultraestrutura de espermatozoides caprinos, *in natura* (A e B) e congelado (C, D, E e F) em leite desnatado e glicérol 7%. A: corte longitudinal da cabeça com membranas plasmática e acrossomal íntegras (seta); B: corte longitudinal da cabeça com membrana plasmática rompida (seta); C: Controle: corte longitudinal da cabeça com rompimento (seta) e edema (*) da membrana plasmática; D: GSH 2mM mL⁻¹: corte longitudinal da cabeça com ondulação da membrana plasmática (*); E: GSH 5mM mL⁻¹: corte longitudinal da peça intermediária com rompimento da membrana plasmática (seta); F: GSH 7mM mL⁻¹: corte transversal da peça intermediária com destruição das mitocôndrias (seta).

íntegros do que as dos grupos tratados com GSH (2, 5 e 7mM mL⁻¹). Menos ($P < 0,05$) espermatozoides com axonemas íntegros foi observado no GSH 7mM mL⁻¹ do que nos demais grupos. O grupo Controle apresentou maior porcentagem ($P < 0,05$) de gametas com mitocôndrias íntegras do que os de GSH (5 e 7mM mL⁻¹), mas não diferiram ($P > 0,05$) do sêmen *in natura* e do GSH 2mM mL⁻¹. No sêmen congelado, observaram-se células com perda de material acrossomal; edema, ondulação e rompimento da membrana plasmática na cabeça (Figuras 1C, 1D) e cauda (Figura 1E); desorganização do axonema e das mitocôndrias (Figura 1F).

Conforme o esperado, o sêmen *in natura* apresentou maior percentual de gametas com membrana plasmática, acrossoma e mitocôndrias íntegras, em virtude de não ter sido submetido a nenhum estresse térmico, químico ou de manipulação. Todavia, devido ao ejaculado ser composto de várias

subpopulações, com gametas de diferentes épocas de maturação (HAFEZ & HAFEZ, 2004), justifica as alterações na estrutura dessas células *in natura*, porém em menor proporção do que nas congeladas (Controle e GSH).

Lesões na membrana plasmática (cabeça e cauda) foram semelhantes às descritas em espermatozoides de bodes (HASHIDA et al., 2005), apesar de os gametas possuírem tamanhos, formas e composição lipídica distintas (PURDY, 2006). As análises com sondas fluorescentes e MET mostraram resultados semelhantes, ao evidenciarem que, apesar de não diferirem estatisticamente, o percentual de gametas com membrana plasmática íntegra na região da cabeça foi maior no grupo GSH 2mM mL⁻¹ do que no Controle. A baixa MP observada nos espermatozoides congelados de caprinos pode ser justificada pela ocorrência de danos ultraestruturais nas membranas plasmática e acrossomal (LEBOEUF et al., 2000).

No presente trabalho, por meio das análises realizadas foi possível elucidar o comportamento da célula criopreservada em meio adicionado de glutathione reduzida em diferentes concentrações, podendo ajudar na formulação de diluidores mais eficazes quanto às suas propriedades antioxidativas. Os parâmetros avaliados podem identificar portadores de deficiência reprodutiva e direcionar a seleção de reprodutores capacitados a programas de melhoramento genético auxiliados pela reprodução assistida.

Por conseguinte, de acordo com os resultados obtidos, conclui-se que a adição de GSH (2, 5 e 7 mM mL⁻¹) em diluente à base de leite desnatado e glicerol 7% para congelamento do sêmen caprino não preserva a integridade dos espermatozoides.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa durante a realização do Doutorado; à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado do Pernambuco (FACEPE); ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro e à Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária da Paraíba S. A (EMEP/PA), pela autorização de uso dos reprodutores.

REFERÊNCIAS

- BATISTA, A.M. et al. Efeito dos métodos *Swim-up* e Percoll sobre a viabilidade espermática de amostras criopreservadas de sêmen caprino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. 18., 2009, Belo Horizonte, Brasil. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 2009. p.409. (CD Rom).
- BILODEAU, J.F. et al. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, v.56, p.275-286, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X01005623>>. Acesso em: 24 ago. 2011. doi:10.1016/S0093-691X(01)00562-3.
- CHECK, M.L.; CHECK, J.H. Poor hypo-osmotic swelling test results from cryopreserved sperm despite preservation of sperm motility. **Archives of Andrology**, v.26, p.37-41, 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2009029>>. Acesso em: 24 ago. 2011. doi: 10.3109/01485019108987624.
- COLETO, Z.F. et al. Avaliação do sêmen congelado de caprinos com drogas fluorescentes. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.24, p.101-104, 2002.
- FOOTE, R.H. et al. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v.71, p.13-23, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432002000180>>. Acesso em: 24 ago. 2011. doi:10.1016/S0378-4320(02)00018-0.
- GADEA, J. et al. 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. Disponível em: <<http://www.andrologyjournal.org/cgi/content/abstract/26/3/396>>. Acesso em: 24 ago. 2011. doi: 10.2164/jandrol.04155.
- GADEA, J. et al. Decrease in glutathione content in boar sperm after cyopreservation: effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. **Theriogenology**, v.62, p.690-701, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X03004655>>. Acesso em: 24 ago. 2011. doi:10.1016/j.theriogenology.2003.11.013.
- GADEA, J. et al. 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, 2008. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2605.2007.00756.x/full>>. Acesso em: 24 ago.2011. doi: 10.1111/j.1365-2605.2007.00756.x.
- GADEA, J. et al. 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. Disponível em: <<http://www.andrologyjournal.org/cgi/content/full>>. Acesso em: 24 ago. 2011. doi: 10.2164/jandrol.05057.
- GARDÓN, J.C. et al. Addition of reduced glutathione to thawing medium improved the sperm motility and reduced ROS generation in frozen ovine and caprine spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v.18, p.155, 2003. Disponível em: <<http://www.publish.csiro.au/?paper=RDv18n2Ab94>>. Acesso em: 24 ago. 2011. <http://dx.doi.org/10.1071/RDv18n2Ab94>.
- GUERRA, M.M.P. et al. Papel de oxidantes e antioxidantes na andrologia (Revisão de literatura). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.28, p.187-195, 2004. Disponível em: <<http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/v28n4.pdf>>. Acesso em: 26 ago. 2011.
- GUTHRIE, H.D.; WELCH G.R. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. **Journal of Animal Science**, v.84, p.2089-2100, 2006. Disponível em: <<http://jas.fass.org/content/84/8/2089.full.pdf+html>>. Acesso em: 24 ago. 2011. doi:10.2527/jas.2005-766.
- HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. São Paulo: Manole, 2004. 513p.
- HASHIDA, N.H. et al. Ultrastructural studies of fresh, frozen-thawed and acrossome-reacted goat sperm. **Biomedical Research**, v.16, p.119-123, 2005. Disponível em: <<http://www.biomedres.org/journal/pdf/125.pdf>>. Acesso em: 24 ago. 2011.
- HECHT, D.; ZICK, Y. Selective inhibition of protein tyrosine phosphatase activities by H₂O₂ and vanadate in vitro. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.188, p.773-779, 1992. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X92911238>>. Acesso em: 24 ago. 2011. doi:10.1016/0006-291X(92)91123-8.

- KHALIFA, T.A.A.; EL-SAID, B.E. Pellet-freezing of Damascus goat semen in a chemically defined extender. **Animal Reproduction Science**, v.93, p.303-315, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432005002423>>. Acesso em: 24 ago. 2011. doi:10.1016/j.anireprosci.2005.08.008.
- LEBOEUF, B. et al. Production and storage of goat semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.113-141, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432000000>>. Acesso em: 24 ago. 2011. doi:10.1016/S0378-4320(00)00156-11561.
- MARCO-JIMÉNEZ, F. et al. Morphometric changes in goat sperm heads induced by cryopreservation. **Cryobiology**, v.52, p.295-304, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0011224006000046>>. Acesso em: 24 ago. 2011. doi:10.1016/j.cryobiol.2006.01.002.
- MAXWELL, W.M.C.; WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.55-65, 1996. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432096015448>>. Acesso em: 24 ago. 2011. doi:10.1016/0378-4320(96)01544-8.
- MORTIMER, S.T.; MAXWELL, W.M.C. Kinematic definition of ram sperm hyperactivation. **Reproduction, Fertility and Development**, v.11, p.25-30, 1999. Disponível em: <<http://www.publish.csiro.au/nid/44/paper/RD99019>>. Acesso em: 24 ago. 2011. doi:doi.org/10.1071/RD99019.
- PESCH, S.; BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. **Micron**, v.37, p.597-612, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968432806000217>>. Acesso em: 24 ago. 2011. doi:10.1016/j.micron.2006.02.006.
- PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v.63, p.215-225, 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0921448805000763>>. Acesso em: 24 ago. 2011. doi:10.1016/j.smallrumres.2005.02.015.
- ROTH, T.L. et al. Heterologous in vitro fertilization and sperm capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx dammah*). **Biology of Reproduction**, v.58, p.475-482, 1998. Disponível em: <<http://www.bioreprod.org/content/58/2/475.full.pdf+html>>. Acesso em: 24 ago. 2011. doi: 10.1095/bioreprod58.2.475.
- SARAIVA, K.L.A. et al. Chronic treatment with sildenafil stimulates Leydig cell and testosterone secretion. **International Journal of Experimental Pathology**, v.90, p.454-462, 2009. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/iep.2009.90.issue-4/issueetoc>>. Acesso em: 24 ago. 2011. doi: 10.1111/j.1365-2613.2009.00660.x.
- SIAS, B. et al. Cloning and seasonal secretion of the pancreatic lipase-related protein 2 present in goat seminal plasma. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v.1686, p.169-180, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1388198104001635>>. Acesso em: 24 ago. 2011. doi:10.1016/j.bbailip.2004.09.008.
- SINHA, M.P. et al. The effect of glutathione on motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. **Animal Reproduction Science**, v.41, p.237-43, 1996. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432095014500>>. Acesso em: 24 ago. 2011. doi:10.1016/0378-4320(95)01450-0.
- STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. **SAS/STAT: user's guide**. Version 6. 4.ed. Cary, 2001. V.2. (CD-Rom).
- VERSTEGEN, J. et al. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v.57, p.149-179, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X01006641>>. Acesso em: 24 ago. 2011. doi:10.1016/S0093-691X(01)00664-1.
- VILLEMURE, M. et al. Isolation and characterization of gelatine-binding proteins from seminal plasma. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.1, p.39, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC155548>>. Acesso em: 24 ago. 2011. doi: 10.1186/1477-7827-1-39.