

1 **UTILIZAÇÃO DE PENTOXIFILINA E ANTIOXIDANTES NA**
2 **CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN BOVINO: QUALIDADE SEMINAL E**
3 **ESTRESSE OXIDATIVO**

4 *UTILIZATION OF PENTOXIFYLLINE AND ANTIOXIDANTS IN*
5 *CRYOPRESERVATION OF BOVINE SEMEN: SEMEN QUALITY AND*
6 *OXIDATIVE STRESS*

7
8 **RESUMO**

9 O presente estudo avaliou a adição da pentoxifilina, tocoferol, ascorbato e suas
10 combinações sobre a proteção da célula espermática bovina contra os efeitos deletérios da
11 criopreservação. Foram utilizados 24 touros Nelore (*Bos taurus indicus*), criados em sistema
12 semi-intensivo. Foi coletado um ejaculado de cada reprodutor, que foi diluído em extensor
13 TRIS-citrato-gema-glicerol, divididos em seis partes, e então suplementados com: sem
14 aditivos (controle), tocoferol (10 mmol/mL), tocoferol (10 mmol/mL) + pentoxifilina
15 (1mg/mL), ascorbato (0,45mg/mL), ascorbato (0,45mg/mL) + pentoxifilina (1mg/mL) ou
16 pentoxifilina (1mg/mL). Após o descongelamento, as amostras foram avaliadas quanto à
17 motilidade e características do movimento, integridade da membrana plasmática e de
18 acrossomo e atividade mitocondrial. Os níveis de peroxidação lipídica espontânea e induzida
19 foram avaliados pela produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). A
20 suplementação não alterou ($P>0,05$) a atividade mitocondrial, integridade acrossomal, e a
21 concentração de TBARS espontâneo e induzido. A adição de tocoferol + pentoxifilina reduziu
22 a motilidade progressiva quando comparado ao ascorbato e também a integridade da
23 membrana espermática quando comparado ao controle e ao ascorbato ($P<0,05$). Já a adição de
24 ascorbato + pentoxifilina foi deletéria sobre linearidade em comparação ao tratamento
25 ascorbato ($P<0,05$). A adição de ascorbato, tocoferol e pentoxifilina individualmente ou em

26 combinação, não foi eficiente em diminuir os danos causados pela criopreservação e estresse
27 oxidativo em amostras pós descongelamento de sêmen bovino

28 **Palavras chave:** Ascorbato, Espécies reativas ao oxigênio, Espermatozóide, Estresse
29 oxidativo, Tocoferol

30

ABSTRACT

31 The present study evaluated the addition of pentoxifylline, tocopherol and ascorbate
32 and their combinations on the protection of bovine spermatic cells against the deleterious
33 effects of cryopreservation. Was using 24 Nelore bulls (*Bos Taurus indicus*), raised in a semi-
34 intensive system. One ejaculation was collected from each bull and diluted in tris-citrate-yolk-
35 glycerol, divided into six portions, and then supplemented with: no additives (control);
36 tocopherol (10 mmol/ml), tocopherol (10 mmol/ml) + pentoxifylline (1 mg/ml), ascorbate
37 (0.45 mg/ml), ascorbate (0.45 mg/ml) + pentoxifylline (1 mg/ml) or pentoxifylline (1 mg/ml).
38 After thawing, the samples were evaluated for motility and characteristics of movement,
39 acrosomal and plasma membrane integrity, and mitochondrial activity. Spontaneous and
40 induced lipid peroxidation levels were evaluated by the production of thiobarbituric acid
41 reactive substances (TBARS). Supplementation did not alter mitochondrial activity,
42 acrosomal integrity, or the spontaneous and induced TBARS concentration ($P>0.05$). The
43 addition of tocopherol + pentoxifylline reduced progressive sperm motility when compared to
44 ascorbate as well as the spermatic membrane integrity when compared to the control and
45 ascorbate treatments ($P<0.05$). When ascorbate + pentoxifylline were added, linearity was
46 decreased compared to the ascorbate treatment ($P<0.05$). The ascorbate, tocopherol and
47 pentoxifylline additions, both individually and in combinations, were inefficient in decreasing
48 the damage caused by cryopreservation and oxidative stress in post-thawed bovine semen
49 samples.

50 **Keywords:** Ascorbate, Reactive oxygen species, Spermatozoon, Oxidative stress,
51 Tocopherol.

52

53

INTRODUÇÃO

54 O uso de tecnologias da reprodução assistida, que tem o sêmen criopreservado como
55 parte fundamental, é imprescindível em um modelo pecuário que visa otimizar características
56 produtivas e reprodutivas do rebanho (HOLT, 2000).

57 Entretanto, o processo de criopreservação do sêmen resulta em diminuição de qualidade
58 em cerca de 40-50% quando comparada ao sêmen fresco, as razões para essas perdas são
59 várias como morte celular ou danos no estado funcional dos espermatozoides sobreviventes
60 levando a uma redução de fertilidade (WATSON, 2000). Esses danos oxidativos ocorrem
61 devido formação excessiva de espécies reativas ao oxigênio (ROS), principalmente o ânion
62 superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH^\bullet) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MAIA e
63 BICUDO, 2009), induzindo a peroxidação lipídica que acarreta alterações na estrutura e na
64 permeabilidade das membranas celulares, alterando sua funcionalidade, causando disfunção
65 espermática e diminuição da motilidade e fertilidade (DROGE, 2002).

66 Em pequenas quantidades, as ROS são necessárias para o funcionamento normal da
67 célula (ex: a capacitação espermática, hiperativação da motilidade e reação acrossomal)
68 (O'FLAHERTY et al., 2003), o problema é quando ocorre desbalanço no sistema oxidante-
69 antioxidante, em favor do oxidante, provocando efeitos deletérios através do estresse
70 oxidativo (DOWLING e SIMMONS, 2009).

71 O tocoferol é considerado como o principal antioxidante de membranas celulares, pois
72 não atua somente eliminando as ROS da membrana, mas também intercepta radicais peroxil e
73 álcoois, que são gerados durante a conversão de hidroperóxidos lipídicos e alimentam a
74 reação em cadeia da peroxidação, impedindo que este processo prejudicial se propague

75 através da membrana plasmática (BANSAL e BILASPURI, 2009). O ascorbato é um potente
76 antioxidante hidrossolúvel que melhora a motilidade e viabilidade espermática pós
77 descongelamento (HU et al., 2010). E a pentoxifilina é um derivado da metilxantina, inibidor
78 da fosfodiesterase, aumentando concentrações intracelulares de adenosina monofosfato cíclico
79 (AMPC) que prolonga o tempo de viabilidade e a motilidade pós descongelamento do sêmen
80 criopreservado bovino (DE LA VEGA et al., 1997) e refrigerado de equinos (GOULART et
81 al., 2004).

82 Com isso, objetivou-se avaliar os efeitos da adição da pentoxifilina, tocoferol e ascorbato
83 separados ou associados na proteção da célula espermática bovina contra os efeitos
84 provocados pela criopreservação.

85 MATERIAL E MÉTODOS

86 Foram utilizados 24 reprodutores da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) com idade média
87 de 31 meses e peso vivo médio de 632 kg, criados em sistema semi-intensivo, com boa
88 condição corporal (escore 3 na escala 1-5), provenientes da Fazenda Paraíso Toca do Tatu,
89 município de Santo Antônio do Leverger–MT, mantidos em pasto de *Brachiaria brizantha* cv.
90 Marandu, com mistura mineral comercial e água ad libitum. Foi coletado um ejaculado de
91 cada reprodutor através do método de eletroestimulação, em seguida alíquotas foram retiradas
92 para a realização dos exames imediatos para avaliação do ejaculado. Ejaculados com valores
93 inferiores a 70% de motilidade e com a porcentagem de patologia espermáticas totais
94 superiores a 30% foram descartados (CBRA, 2013). Os ejaculados que estavam dentro dos
95 parâmetros foram encaminhados para o congelamento manual, que foi realizado em
96 laboratório montado em um local próximo à coleta, sem o controle da temperatura ambiental.

97 Após avaliação imediata, cada ejaculado foi dividido em seis frações e diluído em
98 extensor TRIS-citrato-gema (3,187g TRIS-hidroximetil amino metano; 1,78g ácido cítrico
99 monohidratado; 1,316g frutose; 80 mL água destilada; 20 mL gema de ovo; 1000µg/mL

100 diluidor de estreptomicina; 1000UI/mL diluidor de penicilina para cada 100 mL de diluidor)
101 (Fração A) na concentração de 10^8 espermatozoides/mL. Sendo então, resfriadas por 4 horas a
102 4°C. Em seguida, foi adicionada a Fração B (TRIS-citrato-gema + 8% glicerol) na proporção
103 1:1.

104 Os aditivos utilizados foram: CO- Controle (sem aditivos); TO- tocoferol (
105 10 mmol/mL); TOPE- tocoferol (10 mmol/mL) + pentoxifilina (1mg/mL); AS- ascorbato
106 (0,45mg/mL); ASPE- ascorbato (0,45mg/mL) + pentoxifilina (1mg/mL); PE- pentoxifilina
107 (1mg/mL). Os aditivos foram adicionados ao sêmen diluído no momento do envase em
108 palhetas de 0,5 mL. Em seguida, elas foram colocadas a cinco cm de vapor de nitrogênio por
109 15 minutos, e mergulhadas em nitrogênio líquido (-196°C) e posteriormente armazenadas em
110 botijões criogênicos. O descongelamento do sêmen foi realizado em banho Maria a 37°C por
111 30 segundos.

112 Após o descongelamento das amostras, foram retiradas alíquotas para avaliação da
113 motilidade espermática e avaliação do estresse oxidativo posteriormente, lâminas foram
114 confeccionadas para avaliação da integridade da membrana plasmática (WHO, 1992),
115 integridade acrossomal (POPE et al., 1991) e atividade citoquímica mitocondrial (HRUDKA,
116 1987).

117 Para integridade de membrana plasmática foi utilizada a coloração de eosina-nigrosina,
118 identificando os espermatozoides vivos e mortos. Para a confecção da lâmina retirou-se uma
119 alíquota de sêmen (8 µl) e misturou-se ao corante na proporção 1:1, o preparo era mantido
120 incubado por cerca de 60 segundos em mesa aquecida a 37° C antes de se realizar o esfregaço
121 sobre lâminas de microscopia. A avaliação dos espermatozoides foram feitas em
122 magnificação de 1000 vezes, sob óleo de imersão, usando microscopia convencional. Foram
123 avaliados 100 espermatozóides por lâmina, e classificados em células com membrana
124 íntegra/vivo (não coradas) e não íntegra/morta (coradas).

125 Para integridade acrossomal foi utilizada a Coloração Simples Fast-Green/Rosa-
126 Bengala. Para a confecção da lâmina retirou-se uma alíquota de sêmen (7 µl) e misturou-se ao
127 corante na proporção 1:1, o preparo era mantido incubado por cerca de 60 segundos em mesa
128 aquecida a 37° C antes de se realizar o esfregaço sobre lâminas de microscopia. A avaliação
129 dos espermatozoides foram feitas em magnificação de 1000 vezes, sob óleo de imersão,
130 usando microscopia convencional. Foram avaliados 100 espermatozoides por lâmina, e
131 classificados em células com acrossomo íntegro (região acrossomal de coloração lilás a roxa,
132 ligeiramente mais escura que a região pós acrossomal) e acrossomo não-íntegro (região
133 acrossomal de coloração rosa, ligeiramente mais clara que a região pós acrossomal).

134 Para avaliação de atividade citoquímica mitocondrial, uma alíquota de 25 µL de sêmen
135 foi incubada com 25 µL de DAB (3,3'-diaminobenzidina) (1mg/mL PBS) a 37°C (banho
136 maria), em condições de luminosidade reduzida, durante uma hora. Após a incubação foram
137 realizadas extensões em lâmina, e fixadas em formaldeído a 10% por 10 minutos e secos ao ar
138 protegidas de luz. A avaliação foi realizada em microscopia de contraste de fase sob
139 magnificação de 1000x, em imersão. Foram classificados 100 espermatozóides por amostra, e
140 avaliados segundo a atividade mitocondrial da peça intermediária, obedecendo uma escala de
141 quatro classes propostas por Hrudka (1987), onde: classe I (DAB 1; todas as mitocôndrias
142 ativas, células espermáticas com peça intermediária totalmente corada), classe II (DAB 2;
143 células espermáticas com segmentos ativos e inativos com predominância dos ativos, corados,
144 indicando atividade mitocondrial média a alta), classe III (DAB 3; espermatozoides com
145 menos da metade da bainha mitocondrial ativa), classe IV (DAB 4; espermatozoides
146 completamente inativos com peça intermediária totalmente descorada).

147 A motilidade espermática pós-descongelamento foi avaliada no analisador
148 computadorizado Hamilton Thorne (CASA – Computer-Assisted Sperm Analysis; HTR
149 Ceros 12.1.). O equipamento foi calibrado de acordo com o padrão para avaliação de célula

150 espermática bovina, com 30 quadros a uma taxa de 60Hz, contraste mínimo de 80, tamanho
151 mínimo da célula de 5 pixels. As variáveis observadas foram motilidade (MOT;%),
152 motilidade progressiva (PROG; %), velocidade média de trajetória (VAP; $\mu\text{m/s}$), linearidade
153 (LIN; %) e amplitude de deslocamento (ALH; μm).

154 O estresse oxidativo espontâneo (TBARS espontâneo) foi calculado segundo a
155 metodologia de Buege e Aust (1978). Após o descongelamento 500 μL de sêmen e 1000 μL de
156 uma solução a 10% (v:v) de ácido tricloroacético gelado (TCA 10%) foram homogeneizados
157 e centrifugados (18,000 \times g, 15 min, 15 °C), para a precipitação de proteínas. Após
158 centrifugação uma alíquota do sobrenadante (500 μL) foi misturado com 500 μL de 1% (v:v)
159 de ácido tiobarbitúrico (TBA 1%, diluído em 0,05N de NaOH) em tubos e incubado em água
160 fervente (90 a 100°C) por 15 min. Após este período, os tubos contendo a mistura foram
161 imediatamente resfriados em banho de gelo (0°C) para parar a reação. A absorbância das
162 amostras foram então quantificadas utilizando-se um espectrofotômetro em comprimento de
163 onda de 532 nm. Os resultados foram comparados a uma curva padrão previamente preparada
164 com uma solução padrão de MDA. A concentração de TBARS foi determinada utilizando um
165 valor de $1,56 \times 10^5$ M/mL com o coeficiente de extinção molar do MDA. O índice de
166 peroxidação lipídica foi descrito em nanogramas de TBARS por 10^6 espermatozoides
167 (BUEGE; AUST, 1978). Para a determinação do estresse oxidativo induzido (ou
168 lipoperoxidação induzida, TBARS induzido) uma amostra de 200 μL de sêmen foi
169 inicialmente lavado duas vezes, com a finalidade de remover os resquícios de diluidor,
170 acrescentando 1600 μL de PBS, homogeneizando, centrifugando (800 \times g, 10 min) e retirando-se
171 1600 μL do preparo. Após a lavagem foi acrescentado sulfato de ferro (50 μL , 4 mM) e ascorbato
172 de sódio (50 μL , 20 mM) aos 200 μL da suspensão espermática lavada. Em seguida a amostra
173 foi incubada por uma hora e meia a 37° C (banho maria) com a tampa aberta. Após esse
174 período foi quantificado o estresse oxidativo (BUEGE; AUST, 1978).

175 Os reagentes utilizados eram da marca Sigma–Aldrich (Brasil).

176 O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado. Para as variáveis
177 paramétricas os dados foram analisados através da ANOVA e comparados pelo teste de média
178 Tukey. As variáveis não paramétricas foram comparadas pelo teste Kruskal-Wallis. Ainda foi
179 utilizada análise de correlação de Spearman. Os dados foram analisados com nível de
180 significância de 5%, sendo considerado como tendência estatística valores de P entre 5 e 10%,
181 o programa estatístico utilizado foi o SAS (versão 9.2).

182 **RESULTADOS**

183 O uso dos diferentes aditivos avaliados alterou a variável LIN ($P = 0,0496$), os valores de
184 AS foram superiores ao de ASPE ($44,83 \pm 2,52$ vs $36,16 \pm 3,0$, respectivamente) mas não
185 diferiram de PE, TOPE, CO e TO ($42,45 \pm 2,8$; $42,00 \pm 1,49$; $39,9 \pm 2,85$ e $39,12 \pm 3,3$
186 respectivamente) e uma tendência de alteração para PROG ($P = 0,0922$) (Tabela 1).

187 Para o sêmen suplementado com ASPE verificou-se uma correlação negativa entre
188 DABII e MOT ($r = -0,29$; $P = 0,0004$) e PROG ($r = -0,24$; $P = 0,0032$). Já para TO verificou-
189 se uma correlação negativa entre DAB III e MOT ($r = -0,46$; $P = 0,0250$), PROG ($r = -0,47$; P
190 $= 0,0209$) e VAP ($r = -0,50$; $P = 0,0151$); e entre DAB IV e PROG ($r = -0,41$; $P = 0,0495$) e
191 tendência estatística com VAP ($r = -0,38$; $P = 0,0722$).

192 O uso de aditivos alterou a integridade de membrana plasmática ($P = 0,0065$), os valores
193 do CO e AS foram superiores ao de TOPE ($31,67 \pm 2,81$ e $31,08 \pm 2,42$ vs $20,17 \pm 3,49$,
194 respectivamente) mas não diferiram de TO, PE e ASPE ($28,25 \pm 3,03$; $24,83 \pm 3,02$ e $23,79 \pm$
195 $2,84$, respectivamente) (Figura 1). Foram observadas ainda, correlações positiva entre
196 integridade de membrana e células DAB I para PE ($r = 0,72$; $P < 0,0001$) e ASPE ($r = 0,54$;
197 $P < 0,0001$) e tendência de correlação para TO ($r = 0,40$; $P = 0,0578$) e TOPE ($r = 0,35$; $P =$
198 $0,0876$) e negativa entre integridade de membrana e células DAB II para PE ($r = -0,71$;
199 $P < 0,0001$) e ASPE ($r = -0,41$; $P < 0,0001$) e tendência para TOPE ($r = -0,39$; $P = 0,0549$); e

200 integridade de membrana e células DAB IV para TO ($r = -0,47$; $P = 0,0217$), TOPE ($r = -0,45$;
201 $P = 0,0269$), AS ($r = -0,62$; $P = 0,0013$) e ASPE ($r = -0,43$; $P < 0,0001$).

202 Observou-se uma correlação negativa entre TBARS induzido e células DAB II para
203 ASPE ($r = -0,31$; $P = 0,0001$) e tendência de correlação para PE ($r = -0,38$; $P = 0,0650$),
204 TOPE ($r = -0,36$; $P = 0,0832$) e AS ($r = -0,38$; $P = 0,0666$). E ainda uma correlação positiva
205 para TBARS espontâneo e células PROG para AS ($r = 0,54$; $P = 0,0276$).

206 A atividade mitocondrial (Tabela 2) e concentrações de TBARS espontâneo e induzido
207 (Tabela 3) não foram influenciadas pela suplementação ($P > 0,05$).

208 DISCUSSÃO

209 Não há nenhuma informação na literatura sobre a adição de pentoxifilina associado à
210 tocoferol ou ascorbato na criopreservação de sêmen bovino. No entanto, nossos resultados
211 demonstraram que a combinação desses aditivos provocou um efeito antagônico, sendo que
212 os grupos ASPE e TOPE apresentaram as menores média para integridade de membrana
213 (Figura 1), MOT e PROG (Tabela 1) entre os tratamentos. Gradil e Ball (2000) utilizando
214 concentração de 1 e 2 mg/mL de pentoxifilina no extensor de sêmen equino criopreservado,
215 observaram redução significativa ($P < 0,001$) em todos parâmetros de movimento espermático
216 pós-descongelamento avaliados no CASA, e sugeriram que a pentoxifilina induziu um gasto
217 energético pré-congelamento precoce. Dessa forma a associação da pentoxifilina a
218 antioxidantes no pré-congelamento, pode ter proporcionado condições favoráveis, que levou a
219 uma maior concentração intracelular de AMPc, liberando energia para atividade celular,
220 aumentando seu metabolismo justamente no momento da adição da fração B do diluidor
221 contendo o glicerol, que apesar de sua ação crioprotetora à célula, pode ser ligeiramente
222 tóxico. Dessa forma após o descongelamento as amostras apresentaram menor qualidade,
223 devido ao consumo dos estoques de substrato para produção de ATP, indispensável no

224 movimento espermático levando a redução do metabolismo celular e refletindo negativamente
225 nas características de movimento do espermatozoide.

226 Hu et al. (2010) trabalharam com adição de diferentes concentrações de ascorbato ao
227 meio diluidor e encontraram efeito benéfico ($P < 0,05$) para MOT, LIN e ALH quando utilizou
228 a concentração de 4,5mg/mL em relação ao grupo controle. No presente estudo utilizou-se
229 uma concentração dez vezes menor (0,45mg/mL), o que possivelmente não proporcionou
230 resultados semelhantes aos de Hu et al. (2010). No entanto, observou-se que apesar de não
231 haver sido constatada diferença significativa ($P > 0,05$), as médias obtidas pelo aditivo AS
232 para MOT, PROG, VAP e LIN foram superiores sugerindo um possível efeito positivo
233 quando adicionada ao meio crioprotetor, considerando o alto nível de precisão e confiança da
234 metodologia de avaliação de espermatozoides utilizado pelo CASA.

235 O ascorbato presente na dieta de ruminantes é quase totalmente destruída por
236 microrganismos no rúmen, sendo essencial sua síntese endógena pelo fígado à partir de D-
237 glucose e D-galactose, por isso, em algumas situações (ex: doença, estresse) se torna
238 necessário a suplementação exógena de ascorbato para atender as necessidades fisiológicas
239 (RANJAN, et al., 2012). Nichi et al., (2006) observaram aumento no número total de defeitos
240 espermáticos e concentração de TBARS no sêmen bovino durante o verão em regiões
241 tropicais. Dessa forma, é provável que em condições de estresse calórico, ocorra déficit de
242 ascorbato, levando a um efeito positivo de sua adição ao meio de criopreservação.

243 Foi encontrada correlação negativa entre TBARS induzido e células DAB II, na
244 metodologia para determinação do estresse induzido (TBARS induzido) as células são
245 expostas a condições que favorecem a formação de ROS, justamente para testar sua
246 susceptibilidade ao estresse oxidativo. Ainda foi encontrada correlação positiva entre TBARS
247 espontâneo e células PROG para alguns aditivos, podendo ser uma maior atividade
248 mitocondrial a causa de níveis mais altos de peroxidação lipídica nas amostras. Isto pode ser

249 explicado devido ao fato de que as mitocôndrias são responsáveis pela maior parte da
250 produção endógena de espécies reativas de oxigênio (COPELAND, 2002). No entanto, a
251 produção de espécies reativas de oxigênio é um processo fisiológico importante na
252 hiperativação, reação acrossômica e fusão espermatozoide/oócito (AITKEN et al., 1991) e por
253 isso não podem ser totalmente suprimidas. Sendo assim, mais estudos são necessários para
254 elucidar essa questão.

255 Para integridade de membrana foi encontrada correlação positiva entre células DAB I
256 (PE, TO, TOPE e ASPE) e negativa com células DAB II (PE, TOPE e ASPE) e DAB IV (TO,
257 TOPE, AS e ASPE), que pode ser explicado, uma vez que a membrana plasmática é a
258 estrutura espermática mais sensível a modificações em situações de injúrias como
259 congelamento (BORGES et al., 2011), e esta recobre a peça intermediária, local onde estão
260 localizadas as mitocôndrias na célula espermática.

261 As correlações negativas entre células com menor atividade mitocondrial (DAB II, DAB
262 III e DAB IV) e parâmetros de movimento espermático (MOT, PROG, VAP e LIN) em
263 alguns tratamentos, podem ser explicados pelo fato de que a mitocôndria é responsável por
264 cerca de 90% da produção de energia celular (COPELAND, 2002), utilizada como substrato
265 para o movimento flagelar (KAMP et al., 2003).

266 **CONCLUSÕES**

267 A adição de ascorbato, tocoferol e pentoxifilina individualmente ou em combinação, não
268 foram eficiente em diminuir os danos causados pela criopreservação e estresse oxidativo em
269 amostras pós-descongelamento de sêmen bovino.

270

271

272

273

274

REFERÊNCIAS

- 275 AITKEN, R. J.; IRVINE, D. S.; WU, F. C. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and
276 reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. **American**
277 **Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 164, n. 2, p. 542-551, 1991.
- 278 ANDRADE, E.R.; MELO-STERZA, F.A.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A.; Consequências
279 da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos
280 antioxidantes **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.34, n.2,
281 p.79-85, 2010.
- 282 BANSAL, A.K.; BILASPURI, G.S. Antioxidant effect of vitamin E on motility, viability and
283 lipid peroxidation of cattle spermatozoa under oxidative stress. **Animal Science and**
284 **Papers Reports**. v.27, n.1, p.5-14, 2009.
- 285 BORGES, J.C.; SILVA, M.R.; GUIMARÃES, J.D.; ESPER, C.R.; FRANCESCHINI, P.H.
286 Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio,
287 antioxidantes e criopreservação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.35, n.3,
288 p.303-314, 2011.
- 289 BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation, **Methods of Enzymology**, v. 52,
290 n. 1, p. 302–310, 1978.
- 291 CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal-. **Manual para exame andrológico e**
292 **avaliação de sêmen animal**. 3. ed. Belo Horizonte, 2013, 104 p.
- 293 COPELAND W.C. Mitochondrial DNA: methods and protocols. Totowa, NJ: Humana Press,
294 2002. 420p. **Methods in Molecular Biology**, v.197.

295 De la VEGA, A.C.; WILDE, O.R.; CRUZ, M.L. Efectos de la pentoxifilina y la cafeína sobre
296 la motilidade de espermatozoides bovinos criopreservado. **Avances em Ciências**
297 **Veterinárias**. V.12, n.2, p.75-79, 1997

298 DOWLING, D.K.; SIMMONS, L.W. Reactive oxygen species as universal constraints in life-
299 history evolution. **Proceedings of the Royal Society B**. v.276, p.1737-1745, 2009.

300 DROGE, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiological**
301 **Reviews** v.82 p.47–95, 2002.

302 GOULART, H.M.; SILVA, A. E. D.; McMANUS, C. PAPA, F. O. Efeitos da pentoxifilina
303 sobre a viabilidade *in vitro* dos espermatozoides de equinos, após o resfriamento. **Revista**
304 **Brasileira de Zootecnia**. v.33, n.1, p.112-122, 2004.

305 GRADIL, C.M.; BALL, B.A. The use of pentoxifylline to improve motility of cryopreserved
306 equine spermatozoa. **Theriogenology**. V.54, p.1041-1047, 2000.

307 HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**. v.62,
308 p.3–22, 2000.

309 HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome-c oxidase in
310 spermatozoa and dynamics of changes accompanying ageing or induced by stress.
311 **International Journal of Andrology**, v. 10, n. 6, p. 809-828, 1987.

312 HU, J.H.; TIAN, W.Q.; ZHAO, X.L.; ZAN, L.S.; WANG, W.; LI, Q.W.; XIN, Y.P. The
313 cryoprotective effects of ascorbic acid supplementation on bovine semen quality. **Animal**
314 **Reproduction Science**. v.121, p.72-77, 2010.

315 KAMP, G.; BUSSELMANN, G.; JONES, N.; WIESNER, B.; LAUTERWEIN, J. Energy
316 metabolism and intracellular pH in boar spermatozoa. **Reproduction**, v.126, p.517-525,
317 2003.

318 MAIA, M.S.; BICUDO, S.D.; Radicais livres, antioxidantes e função espermática em
319 mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v.33,
320 n.4, p.183-193, 2009.

321 NICHI, M.; BOLS, P.E.J.; ZUGE, R.M.; BARNABE, V.H.; GOOVAERTS, I.G.F.;
322 BARNABE, R.C.; CORTADA, C.N.M. Seasonal variation in semen quality in *Bos*
323 *indicus* and *Bos Taurus* bulls raised under tropical conditions. **Theriogenology**. v.66,
324 p.822-828, 2006.

325 O'FLAHERTY, C.; BEORLEGUI, N.; BECONI, M.T. Participation of superoxide anion in
326 the capacitation of cryopreserved bovine sperm. **International Journal of Andrology**.
327 V.26, p.109-114, 2003.

328 POPE, C. E.; ZHANG, Y. Z.; DRESSER, B. L. A simple staining method for evaluating
329 acrossomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, n. 1,
330 p. 87-95, 1991.

331 RANJAN, R.; RANJAN, A.; DHALIWAL, G. S.; PATRA, R. C. L-Ascorbic acid (vitamin C)
332 supplementation to optimize health and reproduction in cattle. **Veterinary Quarterly**. v.1,
333 p. 1-6, 2012.

334 WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal**
335 **Reproduction Science**. v.60-61, p.481-492, 2000.

336 WHO World Health Organization. **WHO laboratory manual for the examination of**
337 **human semen and semen - cervical mucus interaction**. Cambridge: The Press
338 Syndicate of the University of Cambridge, 1992. p. 120.

339 Tabela 1- Média \pm desvio padrão e nível de significância (P) das características de movimento (CMOV) pós descongelamento de amostras de
 340 sêmen bovino, para os diferentes aditivos, testados através do CASA

CMOV	Aditivos						P
	CO	TO	TOPE	AS	ASPE	PE	
MOT%	7,25 \pm 1,70	8,66 \pm 2,45	4,41 \pm 0,97	9,37 \pm 2,00	5,58 \pm 1,68	7,45 \pm 1,60	0,6811
PROG%	3,0 \pm 0,72 ^{ab}	3,87 \pm 1,36 ^{ab}	1,50 \pm 0,42 ^b	4,58 \pm 1,06 ^a	2,16 \pm 0,68 ^{ab}	2,75 \pm 0,70 ^{ab}	0,0922
VAP μ m/s	64,38 \pm 5,39	57,79 \pm 5,16	61,59 \pm 2,56	64,80 \pm 4,52	56,26 \pm 5,12	58,63 \pm 3,58	0,8057
LIN%	39,9 \pm 2,85 ^{ab}	39,12 \pm 3,3 ^{ab}	42,00 \pm 1,49 ^{ab}	44,83 \pm 2,52 ^a	36,16 \pm 3,0 ^b	42,45 \pm 2,8 ^{ab}	0,0496
ALH μ m	5,02 \pm 0,65	5,37 \pm 0,62	6,07 \pm 0,57	5,58 \pm 0,46	5,92 \pm 0,67	5,72 \pm 0,60	0,5690

341 ^{a,b} Letras diferentes na mesma linha indicam que houve diferença (P<0,05) pelo teste Tukey. MOT: motilidade, PROG: motilidade progressiva,
 342 VAP: velocidade média de trajetória, LIN: linearidade e ALH: amplitude de deslocamento. CO- Controle (sem aditivos); TO- tocoferol (10
 343 mmol/mL); TOPE- tocoferol (10 mmol/mL) + pentoxifilina (1mg/mL); AS- ascorbato (0,45mg/mL); ASPE- ascorbato (0,45mg/mL) +
 344 pentoxifilina (1mg/mL); PE- pentoxifilina (1mg/mL)

345

346

347

348

349

350

351

352

353 Tabela 2- Média \pm desvio padrão e nível de significância (P) da atividade citoquímica mitocondrial pós descongelamento de amostras de sêmen
 354 bovino, para os diferentes aditivos

Classes	Aditivos						P
	CO	TO	TOPE	AS	ASPE	PE	
DAB 1	46,79 \pm 4,24	49,17 \pm 3,99	43,00 \pm 3,79	47,56 \pm 3,64	39,60 \pm 4,22	42,83 \pm 4,40	0,5707
DAB 2	29,12 \pm 2,40	29,60 \pm 2,39	34,54 \pm 1,82	29,26 \pm 2,17	34,43 \pm 2,64	31,79 \pm 2,22	0,1728
DAB 3	14,87 \pm 2,14	12,69 \pm 2,32	15,00 \pm 2,28	13,21 \pm 2,12	16,82 \pm 2,08	16,08 \pm 2,23	0,6281
DAB 4	9,25 \pm 1,79	8,30 \pm 1,45	7,58 \pm 1,23	10,00 \pm 1,67	9,13 \pm 1,70	9,33 \pm 1,59	0,9562

355 Classes de espermatozoides: (DAB 1) todas mitocôndrias ativas; (DAB 2) predominância de mitocôndrias ativas; (DAB 3) menos da metade das
 356 mitocôndrias ativas; (DAB 4) todas mitocôndrias inativas. CO- Controle (sem aditivos); TO- tocoferol (10mmol/mL); TOPE- tocoferol
 357 (10mmol/mL) + pentoxifilina (1mg/mL); AS- ascorbato (0,45mg/mL); ASPE- ascorbato (0,45mg/mL) + pentoxifilina (1mg/mL); PE-
 358 pentoxifilina (1mg/mL).

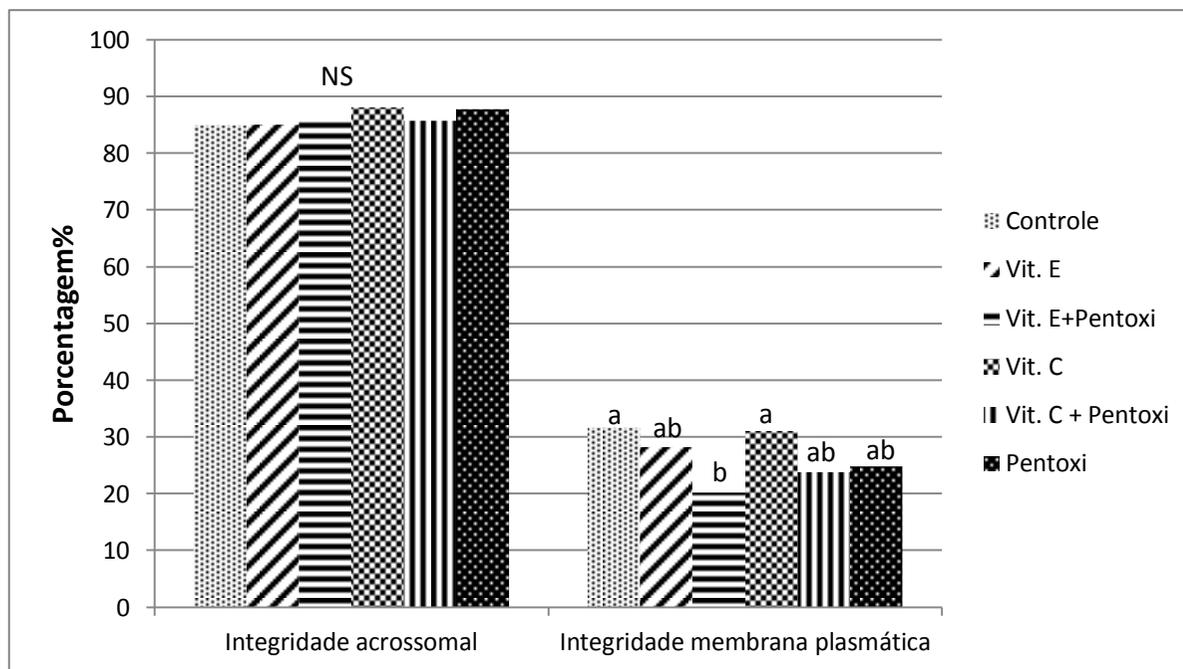
359

360

361 Tabela 3- Média \pm desvio padrão e nível de significância (P) obtidos da concentração de TBARS (ng/10⁶sptz) espontâneo (TE) e induzido (TI)
 362 pós descongelamento, de amostras de sêmen bovino, para os diferentes aditivos, avaliados através de espectrofotômetro

Parâmetros	Aditivos						P
	CO	TO	TOPE	AS	ASPE	PE	
TE	5,98 \pm 2,13	6,46 \pm 2,29	6,65 \pm 2,35	6,62 \pm 2,33	5,88 \pm 2,26	7,54 \pm 2,80	0,9882
TI	62,34 \pm 8,22	66,74 \pm 8,38	63,47 \pm 9,57	58,52 \pm 8,27	63,64 \pm 7,20	61,30 \pm 7,31	0,7668

363 CO- Controle (sem aditivos); TO- tocoferol (10mmol/mL); TOPE- tocoferol (10mmol/mL) + pentoxifilina (1mg/mL); AS- ascorbato
 364 (0,45mg/mL); ASPE- ascorbato (0,45mg/mL) + pentoxifilina (1mg/mL); PE- pentoxifilina (1mg/mL).



365

366 Figura 1- Valores médios obtidos dos parâmetros de integridade do acrossoma e da membrana plasmática espermática de amostras de sêmen
 367 bovino pós-descongelamento, para os diferentes grupos. Em cada conjunto de barras, médias com letras diferentes, diferem significativamente
 368 entre si ($P < 0,05$) pelo teste Tukey.
 369