

CARLOS DE ALMEIDA BAPTISTA SOBRINHO

**Efeito do tratamento com antioxidantes na qualidade de
espermatozóides criopreservados de cães**

São Paulo
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

CARLOS DE ALMEIDA BAPTISTA SOBRINHO

Efeito do tratamento com antioxidantes na qualidade de espermatozóides criopreservados de cães

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof^a Dr^a Valquíria Hyppolito Barnabe

São Paulo
2009

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2180
FMVZ

Baptista Sobrinho, Carlos de Almeida
Efeito do tratamento com antioxidantes na qualidade de
espermatozoides criopreservados de cães. / Carlos de Almeida Baptista
Sobrinho. – 2009.
99 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo,
2009.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Profa. Dra. Valquíria Hyppolito Barnabe.

1. Antioxidantes. 2. Cães. 3. Criopreservação. 4. Estresse oxidativo. 5.
Sêmen. I. Título.

ERRATA

BAPTISTA SOBRINHO, C. A. **Efeito do tratamento com antioxidantes na qualidade de espermatozóides criopreservados de cães.** 2009. 99 f. Tese (Doutorado em Ciências-Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Página
Resumo

Parágrafo
2º

Linha
2ª

Onde se lê
criopreservados de

Leia-se
criopreservados
de cães



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeito do tratamento com antioxidantes na qualidade de espermatozoides criopreservados de cães", protocolado sob o nº1764/2009, utilizando 12 (doze) cães, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Valquiria Hyppolito Barnabe, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Effect of treatment with antioxidants in the quality of cryopreserved canine spermatozoa", protocol number 1764/2009, utilizing 12 (twelve) dogs, under the responsibility Profa. Dra. Valquiria Hyppolito Barnabe, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum" meeting).

São Paulo, 25 de setembro de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BAPTISTA SOBRINHO, Carlos de Almeida

Título: Efeito do tratamento com antioxidantes na qualidade de espermatozoides criopreservados de cães.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ___/___/___

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho,

À minha família, cuja compreensão, amor e estímulo tornaram este sonho possível.

À amizade, desinteressada, leal e verdadeira. Marcílio, Paola, Brasil, Luciana, Marcelo e Sílvia: este trabalho, esta conquista, dedico a vocês.

AGRADECIMENTOS

Esse talvez seja o momento mais difícil, por ter de certa forma, um sabor de despedida. Propositadamente, deixei para o último momento de revisão, mas sei que apesar de tudo, ainda correrei o risco de cometer alguma injustiça, de não citar alguém, e isto, honestamente, se cometi, não foi intencional, mas culpa desse “nó” que me dá no estomago, neste momento.

Chegar até aqui, concluir esse sonho, só foi possível graças à colaboração direta ou indireta de muitas pessoas. Eternizo aqui minha gratidão:

- Ao Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo, pela fraterna acolhida e pela possibilidade de fazer tantos amigos.
- À Prof^a Dr^a Valquíria Hyppolito Barnabe, por ter me concedido, uma vez mais, o privilégio e a honra de sua orientação.
- Ao Prof. Dr. Renato Campanarut Barnabe, seu exemplo de vida e profissionalismo, e principalmente sua amizade, são razões de sobra de orgulho de todos nós pós-graduandos.
- Ao Marcílio, o amigo de todos, seria necessário um capítulo inteiro, só para expressar a minha gratidão. Obrigado meu amigo, por sacrificar tantas horas de seus afazeres pessoais para ajudar não só a mim, mas a tantas pessoas, com seus comentários, sugestões e ensinamentos.
- Ao Prof. Dr. Marcelo Alcindo e à Prof^a Dr^a Silvia Crusco, cuja amizade e entusiasmo me deram o animo para prosseguir e concluir a jornada.
- À Paola, pela amizade e bom astral em qualquer situação. Sua energia e vontade de trabalhar são contagiantes. Agradeço ainda ao Christian e ao Christian Junior,

por todos os momentos em que abdicaram da esposa e mãe, por conta deste trabalho.

- Ao Eduardo, Andressa, Patrícia e Pedro, minha eterna gratidão e amizade. Muito deste trabalho devo a vocês, contem sempre comigo.
- À Thais, D. Sílvia, Miguel, Alice, Harumi e tantos outros funcionários do VRA o meu muito obrigado. Sem vocês, nada seria possível alcançar.
- Aos amigos e oficiais veterinários do Exército Brasileiro, Ten Sílvia e Ten Alexandre, por zelarem pela saúde de nossos cães e providenciarem o suporte e a logística aos experimentos.
- Aos militares da Seção de Cães de Guerra do 2º BPE, pela solicitude, presteza e amizade, mas principalmente por manterem nossos cães de guerra com a dignidade e o respeito que merecem.
- Aos amigos e colegas: Dr. Valdir Avino e Dr^a Veronica Maier, pela ajuda na tradução dos trabalhos e correções.
- Ao grande amigo Prof. Dr. Benedito Wladimir De Martin e à equipe do Instituto Veterinário de Imagem, pelo apoio incondicional em todos os exames solicitados.
- À querida amiga, agora trimamãe, Luciana, pelos valiosos conselhos e orientações.
- À minha esposa Luciane e à minha filhota Mariana, meu especial agradecimento, pelo seu amor, compreensão e carinho.

*“Se eu pudesse deixar algo a você,
Deixaria aceso o sentimento de amar a vida dos seres humanos.
A consciência de aprender tudo o que foi ensinado pelo tempo afora.
Lembraria os erros que foram cometidos, para que não mais se repetissem.
Deixaria para você, se pudesse, o respeito àquilo que é indispensável:
Além do pão ... o trabalho,
Além do trabalho ... a ação,
E quando tudo o mais faltasse, um segredo:
O de buscar no interior de si mesmo
a resposta e a força para encontrar a saída.”*

Mahatma Ghandi

RESUMO

BAPTISTA SOBRINHO, C. A. **Efeito do tratamento com antioxidantes na qualidade de espermatozoides criopreservados de** [Effect of antioxidants on post-thaw canine sperm quality.]. 2009. 99 f. Tese (Doutorado em Ciências-Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Um dos fatores responsáveis pela diminuição expressiva da qualidade espermática pós-criopreservação seria um maior índice de estresse oxidativo, provocado por uma maior produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), não compensada pela proteção antioxidante. O presente experimento visa estudar o efeito do tratamento antioxidante com glutathiona (GSH) e vitamina E, adicionados ao diluidor, na qualidade do espermatozoide pós-criopreservação em cães. Para isso, o sêmen de 12 cães foi dividido em mixes constituídos dos ejaculados provenientes de 3 cães com no mínimo 70% de motilidade. O mix de sêmen foi então dividido em 7 alíquotas e diluídas em extensor a base de gema de ovo e ácido cítrico suplementadas com 0, 1, 5 e 10 mM de GSH e 1, 5 e 10 mM de vitamina E. Após o período de refrigeração as amostras foram analisadas quanto a motilidade e vigor espermáticos. As amostras foram então descongeladas e avaliadas quanto à motilidade, vigor, porcentagem de espermatozoides com membrana (eosina/nigrosina) e acrossomo (Coloração simples) íntegros, atividade mitocondrial (coloração diaminobenzidina) e susceptibilidade das células ao estresse oxidativo (TBARS). Os resultados foram analisados através do SAS System for Windows. Verificou-se que as amostras tratadas com 1 mM de GSH apresentaram maior porcentagem de células com membrana íntegra quando comparadas ao controle ($11,21 \pm 2,84$ e $6,21 \pm 1,16$, respectivamente; $p < 0,05$). A concentração de 5 mM de

GSH apresentou melhores resultados em relação à atividade mitocondrial. Para as amostras tratadas com vitamina E, não houve efeito significativo com exceção da porcentagem de células DAB III, em que amostras tratadas com 1 mM apresentaram melhores resultados em comparação ao controle ($5,61 \pm 0,7$ e $8,62 \pm 1,05$, respectivamente; $p < 0,05$). Os resultados do presente experimento indicam que o tratamento antioxidante de amostras criopreservadas de cães com GSH e vitamina E apresentaram efeitos benéficos para a atividade mitocondrial dos espermatozoides.

Palavras-chave: sêmen. Estresse oxidativo. Cães. Antioxidantes. Criopreservação.

ABSTRACT

BAPTISTA SOBRINHO, C.A. **Effect of antioxidants on post-thaw canine sperm quality** [Efeito do tratamento com antioxidantes na qualidade de espermatozoides criopreservados de cães]. 2009. 99 f. Tese (Doutorado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

One of the main factors known to impair post thaw semen quality is oxidative stress (i.e., higher production of reactive oxygen species not compensated by improved antioxidant protection). The present experiment aimed to evaluate the effects of antioxidant treatment with glutathione (GSH) and vitamin E on the quality of dogs' cryopreserved semen. Towards this aim, semen of twelve dogs was divided into mixes constituted of the ejaculate of three dogs with at least 70% motility. Each mix was then divided into 7 extender treatment groups as follows: Control, Vitamin E – 1, 5, 10 mM, and GSH – 1, 5 and 10 mM. O mix de sêmen foi então dividido em 7 alíquotas e diluídas em extensor a base de gema de ovo e ácido cítrico suplementadas com 0, 1, 5 e 10 mM de GSH e 1, 5 e 10 mM de vitamina E. After cooling, motility and vigor were assessed. Cryopreserved samples were thawed and evaluated for motility, vigor, percentage of sperm showing intact membrane (eosin/nigrosin) and acrosome (Simple stain), mitochondrial activity (diaminobenzidine) and susceptibility to oxidative stress (TBARS). Statistical analyses was performed using the SAS system for Windows. Samples treated with 1 mM of GSH showed higher percentage of intact membrane sperm when compared to the control (11.21 ± 2.84 and 6.21 ± 1.16 , respectively; $p < 0.05$). Treatment with 5 mM of GSH showed better results regarding mitochondrial activity. Effect of

vitamina E treatment was observed only for the percentage of DAB III cels (i.e., cells with severe compromised mitochondrial activity), in which samples treated with 1 mM showed better results when compared to the control group (5.61 ± 0.7 and 8.62 ± 1.05 , respectively; $p < 0.05$). Results of the present study indicate that treatment with GSH and vitamin E to cryopreserved sperm samples of dogs improve post-thaw mitochondrial activity.

Key-words: Semen. Oxidative stress. Dogs. Antioxidant. Cryopreservation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Peroxidação lipídica e sistema de defesa enzimática nos espermatozóides (adaptado de Griveau et al, 1994).....	36
Figura 2	- Estrutura molecular da glutationa	44
Figura 3	- Estrutura molecular da vitamina E	46
Figura 4	- Figura representando o esquema de delineamento.....	48
Figura 5	- Vista das instalações da SecCG do 2º BPE – local das colheitas de sêmen.....	49
Figura 6	- Cães militares utilizados no experimento.....	53
Figura 7	- Equipamentos montados para a execução do experimento.....	53
Figura 8	- Equipamentos montados para a execução do experimento.....	53
Figura 9	- Procedimento de colheita de sêmen.....	54
Figura 10	- Procedimento de colheita de sêmen.....	54

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Efeito do tratamento com diferentes concentrações de GSH (1mM, 5mM e 10mM) em sêmen canino refrigerado (1 hora) sobre a motilidade e vigor espermáticos - Osasco - 2009 66
- Tabela 2 - Efeito do tratamento com diferentes concentrações de Vitamina E (1mM, 5mM e 10mM) em sêmen canino refrigerado (1 hora) sobre a motilidade e vigor espermáticos. Osasco - 2009 67
- Tabela 3 - Efeito do tratamento com diferentes concentrações de Vitamina E (1mM, 5mM e 10mM) em sêmen canino criopreservado sobre a motilidade e vigor espermáticos, integridade de Acrossomo, integridade de Membrana Plasmática (vivos) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) - Osasco - 2009 67
- Tabela 4 - Efeito do tratamento com diferentes concentrações de Vitamina E (1mM, 5mM e 10mM) em sêmen canino criopreservado sobre a atividade mitocondrial espermática (DAB 1 = atividade total; DAB IV = inativa) – Osasco - 2009 70
- Tabela 5 - Efeito do tratamento com diferentes concentrações de GSH (1mM, 5mM e 10mM) em sêmen canino criopreservado sobre a motilidade e vigor espermáticos, integridade de Acrossomo, integridade de Membrana Plasmática (vivos) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) - Osasco - 2009 70
- Tabela 6 - Efeito do tratamento com diferentes concentrações de GSH (1mM, 5mM e 10mM) em sêmen canino criopreservado sobre a atividade mitocondrial espermática (DAB 1 = atividade total; DAB IV = inativa) - Osasco - 2009 71
- Tabela 7 - Coeficientes de correlação (significância) entre as variáveis resposta concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), espermatozóides classes I, II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial (DAB I, II, III e IV), espermatozóides com membrana plasmática íntegra (E/N), espermatozóides com acrossomo íntegro (POPE), Motilidade (MOT) e Vigor (VIG) de amostras espermáticas de cães, coletadas através de manipulação digital e criopreservadas com diferentes concentrações de GSH (0; 1, 5 e 10mM) – Osasco – 2009 73
- Tabela 8 - Coeficientes de correlação (significância) entre as variáveis resposta

concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), espermatozoides classes I, II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial (DABI, II, III e IV), espermatozoides com membrana plasmática íntegra (E/N), espermatozoides com acrossomo íntegro (POPE), Motilidade (MOT) e Vigor (VIG) de amostras espermáticas de cães, coletadas através de manipulação digital e criopreservadas com diferentes concentrações de Vitamina E (0; 1, 5 e 10mM) – Osasco – 2009

LISTA DE SIMBOLOS

DNA	ácido desoxirribonucleico
PUFAs	ácidos graxos poli-insaturados
NAHDP	adenosina difosfato de sódio
α	alfa
O_2^-	ânion superóxido
BPE	Batalhão da Polícia do Exército
β	beta
CCO	citocromo c- oxidase
POPE	coloração simples
Cu^{++}	cobre
DAB	3,3 diaminobenzidina
ROS	espécies reativas de oxigênio
sptz	espermatozóide
EOP	estresse oxidativo positivo
E/N	eosina - nigrosina
Fe^{++}	ferro
γ	gama
GSH	glutathione
GSSG	glutathione oxidada
GPX	glutathione peroxidase
GRD	glutathione reductase
g	gramas

°	graus
°C	graus Celsius
LSD	list estatistical difference
MDA	Malondialdeído
®	marca registrada
<	menor que
CH ₂ ⁻	metileno
μM	micromolar
μg	micrograma
μL	microlitro
mL	mililitro
mM	milimolar
H ₂ O	molécula de água
MOT	motilidade
ng	nanograma
p	nível de significância
NO ₂	óxido nítrico
OONO ⁻	peroxinitrito
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
%	porcentagem
pH	potencial hidrogênio iônico
qsp	quantidade suficiente para
kg	quilograma
OH ⁻	radicais hidroxila
SecCG/2ºBPE	Seção de Cães-de-Guerra do 2º Batalhão de Polícia do Exército

δ	sigma
PBS	solução tampão de fosfato
TBARS	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
SOD	superóxido dismutase
TBA	teste do ácido 2-tiobarbitúrico
UI	unidade internacional
VIG	vigor espermático

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS	22
2	HIPÓTESE	26
3	OBJETIVOS	28
4	REVISÃO DE LITERATURA	30
4.1	CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS DA ESPÉCIE.....	30
4.2	COLHEITA E AVALIAÇÃO DO SÊMEN.....	31
4.3	CRIPRESERVAÇÃO.....	33
4.4	ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO (ROS) E ESTRESSE OXIDATIVO.....	35
4.4.1	Radical superóxido (O₂⁻)	38
4.4.2	Radical hidroxila (OH⁻)	39
4.4.3	Peróxido de hidrogênio (H₂O₂)	39
4.4.4	Danos causados aos espermatozóides pelas ROS	40
4.4.5	Mensuração do estresse oxidativo	40
4.5	ANTIOXIDANTES.....	42
4.5.1	Glutathione (L-γ-glutamyl-L- cisteinilglicina)	44
4.5.2	α – tocoferol (Vitamina E)	46
5	MATERIAL E MÉTODOS	48
5.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	48
5.2	LOCAL.....	49
5.3	DILUIDORES.....	49
5.4	CÃES.....	52
5.5	COLHEITA DE SÊMEN E COMPOSIÇÃO DO <i>POOL</i>	53

5.6	ANÁLISE DE SÊMEN.....	55
5.7	CONGELAÇÃO DO SÊMEN.....	56
5.8	DESCONGELAÇÃO DO SÊMEN.....	56
5.9	TESTES CONVENCIONAIS.....	57
5.9.1	Avaliação da motilidade espermática.....	57
5.9.2	Avaliação do vigor espermático.....	58
5.10	TESTES FUNCIONAIS.....	58
5.10.1	Análise da integridade acrossomal.....	58
5.10.2	Avaliação da integridade da membrana plasmática.....	59
5.10.3	Avaliação da integridade mitocondrial.....	59
5.11	PROVA BIOQUÍMICA.....	60
5.11.1	Avaliação do índice de resistência ao estresse oxidativo.....	61
5.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	62
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
6.1	EFEITO DO TRATAMENTO COM GSH.....	66
6.2	EFEITO DO TRATAMENTO COM VITAMINA E.....	70
6.3	CORRELAÇÕES.....	73
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
	CONCLUSÃO.....	80
	REFERÊNCIAS	82
	ANEXO.....	98

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os cães domésticos sempre estiveram próximos aos homens. Os mais antigos esqueletos de cães datam de cerca de 30.000 anos depois do aparecimento do *homo sapiens sapiens*, e foram encontrados sempre próximos dos acampamentos humanos, daí a denominação *Canis familiaris* (GRANDJEAN e VAISSAIRE, 2001).

Assim, a importância do cão no convívio com os homens é histórica, científica e mitológica. O cão possui um papel muito especial em nossa sociedade. Ele auxilia o homem a caçar, faz companhia, guarda e pastoreio. O cão foi o primeiro animal a ser domesticado, há pelo menos 15.000 anos atrás (ELLEGREN, 2005). Mesmo com o passar de tantos séculos, é cada vez mais relevante a participação do cão no dia a dia com os homens, tornando-se muitas vezes parte integrante de uma família.

Atualmente o cão é importante modelo experimental para várias doenças que acometem os homens, incluindo o câncer (OLSON, 2007). Cada vez mais eles são empregados como adjuvantes de tratamentos médicos, principalmente com idosos e crianças. Em razão disso, o homem tem trabalhado com o intuito de obter animais com alto valor genético, adequados a padrões inerentes à utilização prática (SILVA; SILVA; CARDOSO, 2002), com propósitos que incluem a caça, o pastoreio, o serviço policial, a companhia como animal de estimação, além de outros. Desta forma, a domesticação pelo homem e sua manutenção como animal de companhia, determinaram um processo contínuo e gradativo de seleção na espécie canina.

Desde que o italiano Lazzaro Spalanzani, no século XVII, demonstrou que era possível ocorrer a fecundação, depois da deposição do sêmen, artificialmente, no trato genital feminino, que as biotécnicas relacionadas à reprodução tem evoluído (MAIA, 2006).

Embora o espermatozóide de cães tenha sido descrito microscopicamente em 1672, por Leewenhoek, somente em 1780 Spallanzani, aprofundando as investigações, coletou sêmen de um cão por masturbação, que introduzido no genital de uma cadela

no cio, levou ao nascimento de 3 produtos vivos e normais, após uma gestação de 62 dias (SOUZA, 1985).

A tecnologia da reprodução, aplicada aos cães, tem crescido na prática e na pesquisa em medicina veterinária de pequenos animais, entre elas a criopreservação de sêmen de cães (PEÑA et al., 2006)

A criopreservação do sêmen é uma das principais biotecnologias aplicadas à reprodução, permitindo que o sêmen seja transportado, armazenado e utilizado sempre que necessário. No entanto, sabe-se que esta técnica provoca inúmeras lesões à célula espermática. Um dos principais fatores que levam aos danos causados pela criopreservação é o estresse oxidativo (WANG, 1997). O estresse oxidativo é causado pela ação das espécies reativas de oxigênio (reactive oxygen species - ROS), que podem provocar danos estruturais a biomoléculas, DNA, lipídeos, carboidratos e proteínas, assim como a outros componentes celulares (HALLIWELL, 1991). Entre os danos mais significativos causados pelas ROS estão os produzidos ao material genético do espermatozóide. Isto ocorre, pois mesmo uma célula com DNA lesado pode vir a fertilizar um oócito. Este por sua vez possui mecanismos de reparos (AHMADI; NG, 1999). Estes danos podem não ser reparados completamente resultando em mutações neste DNA (AITKEN; BAKER, 2006). Caso isso ocorra, alguns eventos podem acontecer: falha na fertilização; baixas taxas de implantação; morte embrionária precoce; aborto ou doenças genéticas na prole, incluindo câncer (BAKER; AITKEN, 2005). Mesmo que nenhum destes eventos ocorra, ainda assim, possíveis informações genéticas errôneas podem ser transmitidas e só serem expressas após várias gerações (MARCHETTI; WYROBEK, 2005).

A adição de antioxidantes aos diluidores, para a congelação de sêmen, tem sido empregada em várias espécies, com intuito de minimizar ou reverter os efeitos deletérios produzidos ao espermatozóide, e causados pelos metabólitos reativos do oxigênio, tais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o anion superóxido (O_2^-) e radicais hidroxil (OH).

Em animais, o tratamento de amostras espermáticas com antioxidantes, como a α -tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C) e algumas enzimas antioxidantes, também tem sido estudado com resultados diversos. Uma explicação para os diferentes

resultados seria a concentração utilizada de antioxidante. As ROS possuem papel fundamental em diversos processos fisiológicos do espermatozóide. Assim, caso o tratamento antioxidante não seja realizado de forma criteriosa, testando diversas quantidades de antioxidantes, este tratamento pode se tornar ineficaz ou até mesmo prejudicial.

Assim, com o presente trabalho buscamos avaliar o efeito da adição de glutathione (GSH) e vitamina E, importantes antioxidantes, ao diluente Tris-gema, um dos mais utilizados no congelamento de sêmen. Procuramos ainda saber, se desta forma seria mantida a integridade da membrana e evitado o estresse oxidativo, protegendo assim a célula espermática de cães das lesões de DNA causados pela criopreservação.

HIPÓTESE

2 HIPÓTESE

A adição de antioxidantes vitamina E e glutathiona ao diluente não prejudicará a integridade do espermatozóide e propiciará uma melhora na viabilidade do sêmen canino criopreservado, ao reduzir os efeitos deletérios do estresse oxidativo.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Investigar e comparar, através de provas morfológicas e funcionais, a eficácia dos tratamentos antioxidantes, com a adição de diferentes concentrações de glutathione e vitamina E ao diluidor, para a conservação de sêmen canino congelado.

Quantificar os níveis de peroxidação lipídica nas amostras pós descongelamento, frente aos diferentes tratamentos.

Quantificar a produção de peróxido de hidrogênio e anion superóxido, no espermatozóide canino, frente aos diferentes tratamentos.

Correlacionar os dados de produção de radicais livres com os dados referentes à avaliação da sobrevivência, vitalidade, motilidade e integridade de membrana do espermatozóide canino.

Relatar os dados encontrados durante a execução desta experimentação.

Verificar se a suplementação do diluidor com GSH e α -tocoferol, importantes antioxidantes, será eficaz, diminuindo os danos ao DNA espermático causados pela criopreservação do sêmen de cães.

REVISÃO DE LITERATURA

4 REVISÃO DE LITERATURA

Os cães domésticos possuem um papel importante na sociedade seja como animais de companhia ou, como atualmente vem sendo estudado, modelo experimental.

4.1 CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS DA ESPÉCIE

As grandes variações observadas na espécie canina, quanto ao peso e ao volume entre as diferentes raças, faz com que os ejaculados caninos apresentem oscilações significativas de volume e de concentração espermática, segundo Cunha (1997).

Segundo Souza (1985), Freiberg, em 1935 foi o primeiro a identificar o fracionamento do ejaculado de cães em três partes, propondo ainda que a colheita fosse fracionada.

A primeira fração, também chamada de pré-espermática, tem origem prostática, e destina-se à estabilização do pH e limpeza uretral, variando o volume entre algumas gotas até 2 mL (SILVA; SILVA; CARDOSO, 2002). A segunda fração, ou espermática, tem origem testicular, é rica em espermatozóides, com volume variando de 0,5 mL a 5 mL, conforme a variação individual e o tamanho testicular, possuindo um aspecto turvo, leitoso ou opalescente. A terceira fração é o fluido prostático, fácil de distinguir da fração espermática pelo seu aspecto cristalino, e com volume de até 30 mL (SILVA et al., 2002). Sua função é servir como um meio diluidor natural, proporcionando o transporte dos espermatozóides no trato genital da cadela (FELDMAN; NELSON, 1996; CHRISTIANSEN, 1998).

O trato reprodutivo do cão é constituído por uma bolsa escrotal, dois testículos, dois epidídimos, dois cordões espermáticos, dois ductos deferentes, pênis, prepúcio e próstata (SILVA; SILVA; CARDOSO, 2002). Os testículos são constituídos de células intersticiais, as células de Leydig, que secretam hormônios masculinos; células germinativas, que se diferenciam para formar os

espermatozóides e células de sustentação, ou de Sertoli, formando uma barreira que isola as células germinativas da circulação geral (NASCIMENTO; SANTOS, 2003).

Segundo Oettlé (1993), a primeira descrição do espermatozóide canino foi feita por Leeuwenhoek, em 1679, mas somente com o advento da microscopia, no século XIX, foi possível identificar as principais características morfológicas. A cabeça do espermatozóide é primariamente formada por DNA, que compõe o núcleo, sendo recoberta anteriormente pelo acrossoma e posteriormente pelo envoltório pós nuclear (BARTLET, 1962).

A conformação da membrana plasmática das células espermáticas segue o modelo estrutural de uma bicamada de duplo folheto com fosfolipídios e proteínas associadas (WATSON, 1995). Nos espermatozóides, este duplo folheto não é simplesmente uma bicamada passiva de membrana lipídica em que receptores recebem seus sinais moleculares específicos, mas uma estrutura altamente especializada, que tem um papel ativo na capacidade fertilizante, recebendo sinais e modificando-se ao longo do processo da espermatogênese, trânsito e armazenagem no epidídimo, ejaculação, depósito no trato genital feminino e, finalmente, capacitação e penetração do oócito (CUNHA, 2002).

A membrana plasmática do espermatozóide, na espécie canina, apresenta uma baixa proporção de ácidos graxos poliinsaturados, em relação aos ácidos graxos saturados (BOUCHARD et al., 1990). Essa particularidade provavelmente é responsável pelo espermatozóide canino apresentar uma resistência própria contra o choque térmico, uma vez que as células espermáticas do cão apresentam baixa sensibilidade às oscilações de temperatura (SILVA, 2005).

4.2 COLHEITA E AVALIAÇÃO DO SÊMEN

Um exame andrológico completo em cães, incluindo histórico clínico e reprodutivo, exame físico e a colheita e avaliação do sêmen (JOHNSTON, 1991), além de recursos diagnósticos como a ultrassonografia de testículos, próstata e epidídimos (ENGLAND; PONZIO, 1996), é extremamente importante na avaliação da fertilidade.

Sêmen é a suspensão celular líquida contendo espermatozóides (gametas masculinos) e secreções prostáticas. A porção fluida dessa suspensão, que é formada na ejaculação, é conhecida como plasma seminal (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Diversos métodos de colheita já foram relatados, como por exemplo o uso de vagina artificial, massagem digital, vibrador elétrico e eletroejaculação (CHRISTIANSEN, 1988). A técnica de colheita do sêmen em cães é bastante simples, especialmente em cães condicionados. O sêmen é colhido por estimulação manual do pênis e prepúcio, com o animal em estação (FELDMAN; NELSON, 1996; SANTOS; VANNUCCHI, 1997; VANNUCCHI et al., 1998). O ejaculado é colhido em frações, com auxílio de um funil de vidro ou plástico, acoplado em tubo cônico graduado, pré-aquecido e protegido da luz (CHRISTIANSEN, 1988; BAPTISTA SOBRINHO, 2002; MICHAEL et al., 2008), devendo-se evitar contato direto entre o pênis e o material da colheita, o qual deve ser mantido a aproximadamente 38° C, de acordo com Seager e Platz (1977).

A motilidade espermática é definida como a porcentagem de espermatozóides móveis da amostra avaliada imediatamente após a colheita ou após a criopreservação do sêmen (SEAGER; PLATZ, 1977). A avaliação da motilidade espermática é o parâmetro mais utilizado para a avaliação do sêmen, após a colheita ou a criopreservação do sêmen (CARDOSO et al., 2005). O sêmen de cães é avaliado imediatamente após a colheita, pela motilidade progressiva retilínea, pelas alterações patológicas espermáticas primárias, como cabeça gigante, cabeça pequena, defeitos acrossomais, cauda fortemente dobrada, cauda fortemente enrolada, gota citoplasmática proximal, formas duplas, defeitos de peça intermediária e inserções anormais de cauda; e pelas alterações patológicas espermáticas secundárias, tais como gota distal, cabeça solta e cauda enrolada, além da concentração espermática no ejaculado, segundo Seager e Platz (1977); Souza (1985); Mialot (1988), Santos (1997) e Baptista Sobrinho (2002),

Seager; Fletcher (1972) ressaltaram que a avaliação da motilidade espermática deve ser avaliada imediatamente após a colheita ou a descongelação do sêmen, com auxílio da microscopia óptica. Em seguida, avalia-se o vigor espermático, que é a qualidade da motilidade exibida pelos espermatozóides móveis. Para tal, empregam-se escalas que vão de 0 a 5, conforme o autor (PLATZ; SEAGER, 1977; CHRISTIANSEN, 1988; SILVA, 2005).

Apesar da avaliação da motilidade espermática não ser empregada como uma mensuração dos espermatozoides vivos e mortos, ela fornece a informação de um fator que é necessário para a capacidade fertilizante do espermatozoide, pois é a manifestação da sua competência estrutural e funcional (PEÑA-MARTINEZ, 2004). Embora na espécie canina já tenham reportado que a motilidade está geralmente relacionada à integridade de membrana plasmática e à morfologia, a existência de correlações entre motilidade espermática e fertilidade in vivo ou in vitro permanece por ser melhor esclarecida (SILVA, 2005). E, mesmo em outras espécies, essas relações entre motilidade e fertilidade são ainda bastante conflitantes.

4.3 CRIOPRESERVAÇÃO

O congelamento de sêmen determina a sobrevivência espermática e a fertilidade (CARVALHO et al., 2004), e junto com a inseminação artificial pode contribuir para as trocas genéticas em grandes distâncias e ser utilizada ainda, associada à outras técnicas de reprodução assistida.

A criopreservação é uma biotécnica que permite o armazenamento de material genético por um tempo indefinido (CARDOSO et al., 2005), mas que causa uma diminuição na qualidade espermática após a descongelação

Os protocolos atualmente disponíveis de criopreservação, submetem as células espermáticas à situações de estresse, com comprometimento de sua viabilidade. Entre estas situações, destacam-se a exposição do espermatozoide à temperaturas não fisiológicas, o estresse osmótico causado pelo elevado gradiente de concentração dos solutos no meio diluidor e a formação e dissolução de cristais de gelo no meio extracelular (WATSON, 2000).

A sobrevivência do espermatozoide criopreservado é afetada por vários fatores, como a composição do diluidor, a concentração empregada para o crioprotetor, o tipo de envase, a velocidade dos processamentos de congelação e reaquecimento e, principalmente da qualidade do sêmen empregado.

Um bom diluente deve conter nutrientes, servir como tampão, ajustando as alterações do pH, proteger as células contra o choque térmico durante o processo de resfriamento, possuindo ainda ação crioprotetora, que reduza o dano à célula

espermática durante o processo de congelação e posterior reaquecimento (CONCANNON; BATTISTA, 1989). O sêmen apropriadamente diluído pode ser congelado por tempo indeterminado, permanecendo potencialmente fecundante, quando reaquecido e utilizado em uma inseminação artificial, desde que empregando um bom diluente (SILVA, 2005).

As primeiras tentativas de preservar o sêmen canino, foram feitas a partir de adaptações, ainda que empíricas, de técnicas e diluentes utilizados em outras espécies (HARROP, 1962, apud SILVA, 2005).

A criopreservação do sêmen canino tem sido objeto de várias pesquisas na última década, com o objetivo de melhorar a qualidade do sêmen, que é diminuída após o reaquecimento (MICHAEL et al., 2007)

Para minimizar as oscilações de volume e concentração espermática, descritas por Cunha (1997), torna-se necessária a padronização do processo de congelação do sêmen na espécie canina, para amenizar essas variações e manter constantes o volume e a concentração espermática (CUNHA; LOPES, 1999).

A primeira descrição de congelamento com sucesso, em cães, foi feita por Rowson, em 1954 (SOUZA, 1985), entretanto, somente em 1969, Seager relatou uma gestação na espécie canina, utilizando sêmen congelado, o que impulsionou novos estudos sobre a criopreservação do sêmen de cães (MOURA et al., 1999). O emprego de sêmen canino congelado, através da inseminação artificial, apresenta resultados variáveis sendo a técnica de criopreservação, uma das limitações encontradas.

No Brasil, a primeira notificação de sucesso em inseminação artificial em cães, empregando sêmen congelado data de 1981, conforme relatam Vaske e colaboradores (1981).

Com a finalidade de amenizar ou evitar os efeitos deletérios da criopreservação, alguns agentes crioprotetores são adicionados ao sêmen, promovendo alterações nas propriedades físicas da solução (BARROS, 2007). Os agentes crioprotetores podem ou não atravessar a membrana plasmática, dependendo do seu peso molecular

Rodrigues et al. (1992) analisaram a ultraestrutura dos espermatozoides e a composição do sêmen congelado de cães, observando que as maiores mudanças ocorriam durante os processos de congelação e descongelação, sendo que a motilidade e a integridade do acrossomo diminuíram significativamente.

A avaliação da motilidade após a criopreservação tem como objetivo verificar a proporção de espermatozóides que mantiveram a motilidade após as injúrias causadas por esse processo de conservação (PEÑA, 2000).

As atuais técnicas de congelamento de sêmen de cães diminuem consideravelmente a motilidade progressiva retilínea e o vigor de espermatozóides e aumentam significativamente os defeitos espermáticos maiores (SANTOS, 1997).

A maioria dos pesquisadores tem congelado o sêmen de cães utilizando técnicas descritas para outras espécies. Estes estudos tem demonstrado que o sêmen de cães apresenta taxas de concepção inferiores a outras espécies (GABALDI; LOPES, 1998).

Para o congelamento do sêmen, pouca ou nenhuma fração prostática deve ser colhida, devido ao efeito prejudicial dessa fração sobre a sobrevivência espermática e a criopreservação (CHRISTIANSEN, 1988; GABALDI; LOPES, 1998).

Os problemas relacionados à criopreservação de sêmen estão relacionados principalmente à conformação da membrana plasmática dos espermatozóides (VALENÇA; GUERRA, 2007).

Segundo Bouchard et al. (1990), a membrana plasmática do espermatozóide canino apresenta uma baixa proporção de ácidos graxos poli-insaturados em relação aos saturados. Essa particularidade seria o fator responsável pelo espermatozóide canino exibir uma resistência própria contra o choque térmico, uma vez que as células espermáticas do cão apresentam baixa sensibilidade às oscilações de temperatura.

4.4 ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO E ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é uma condição comum sofrida pelos sistemas biológicos em condições aeróbicas (GARRIDO et al., 2004). O desequilíbrio entre as moléculas antioxidantes e as moléculas pró-oxidativas, também chamadas de espécies reativas do oxigênio, ou ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*, em um complexo biológico, é a definição para o estresse oxidativo.

ROS são encontrados em todos os sistemas biológicos (MAIA, 2006). Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, a molécula do oxigênio sofre

uma reação tetravalente, aceitando quatro elétrons e resultando na formação de água. No decorrer desse processo, intermediários reativos são formados como os radicais superóxidos, hidroperoxila e hidroxila, além do peróxido de hidrogênio, que não é um radical. Normalmente a redução completa do oxigênio ocorre na mitocôndria e a reatividade das ROS é neutralizada pela entrada dos quatro elétrons (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

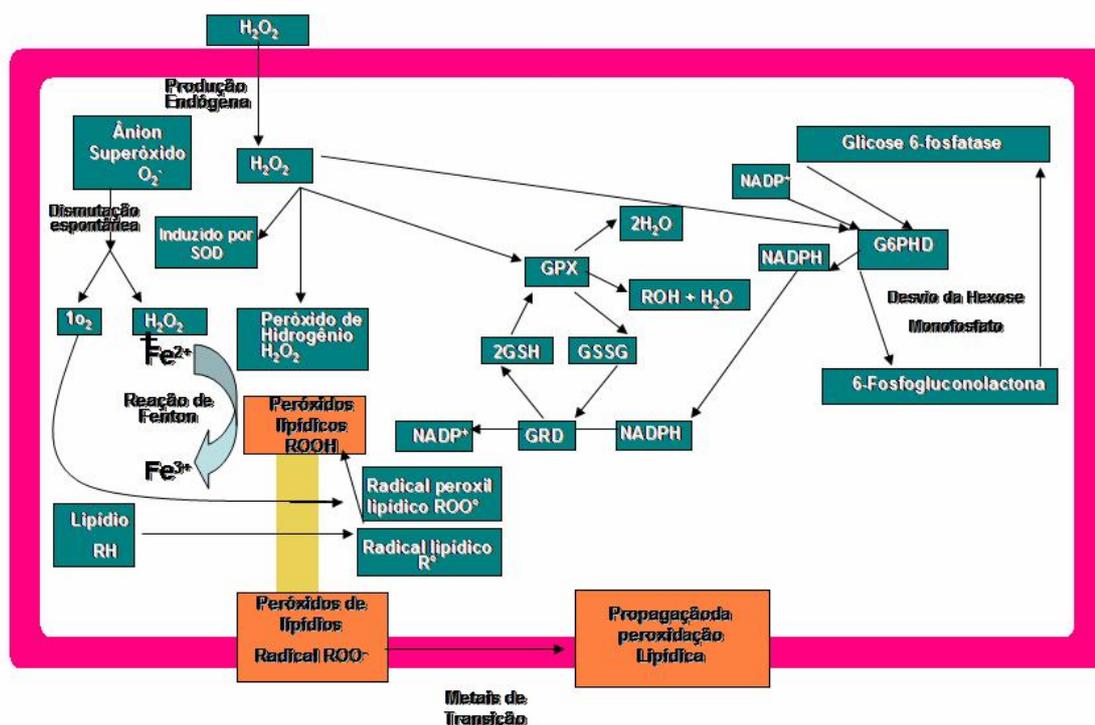


Figura 1 -Peroxidação lipídica e sistema de defesa enzimática nos espermatozoides (adaptado de GRIVEAU et al, 1995)

Entre as espécies reativas de oxigênio, as mais importantes são o radical hidroxila (OH^\cdot), o anion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o óxido nítrico (NO_2). O anion superóxido e o peróxido de hidrogênio são as ROS que são formadas primariamente, sendo que o peróxido de hidrogênio produzido pela dismutação, enzimática ou não, do anion superóxido (HALLIWELL; GUTERIDGE, 1989). O radical hidroxila (OH^\cdot) é a espécie reativa do oxigênio mais reativa e prejudicial, podendo ser formado através do peróxido de hidrogênio e do anion superóxido, e através da reação do anion superóxido com o óxido nítrico, que

produz o peroxinitrito (OONO^-), que se decompõe em NO_2 e OH^- (Figura 1) (HALLIWELL, 1991).

Um dos principais fatores que levariam a danos de DNA espermático, após o processo de criopreservação seria o ataque das ROS, que provocariam estresse oxidativo. Este tipo de estresse causa danos estruturais a biomoléculas, DNA, lipídeos, carboidratos e proteínas, assim como a outros componentes celulares (HALLIWELL, 1991). Trabalhos anteriores verificaram que o espermatozóide é particularmente susceptível ao ataque dos ROS (JONES; MANN, 1977). Tal fato deve-se à pequena quantidade de citoplasma na célula espermática normal, o que limita a quantidade de antioxidantes, principalmente os enzimáticos (VERNET et al., 2004). Além disto, a grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (polyunsaturated fatty acids - PUFA) na membrana espermática, que permite a fluidez necessária para os eventos associados à fertilização (PARKS; HAMMERSTEDT, 1985; LENZI et al., 2000; AGARWAL; SALEH; BEDAIWI, 2003) torna os espermatozóides ainda mais vulneráveis. As ROS atacam as ligações duplas (insaturações) nas moléculas, o que enfraquece a ligação carbono-hidrogênio no átomo de hidrogênio adjacente, tornando-o susceptível à clivagem. Além da sensibilidade da membrana espermática à lipoperoxidação, devido às características da mesma, ocorre a incapacidade de ressintetizar os componentes estruturais da membrana, embora estes não sejam os únicos prejuízos ao espermatozóide provocados pelas ROS (MICHAEL et al., 2007)

As ROS apresentam um papel fundamental em diversos processos fisiológicos, sendo importante para a regulação da taxa de hiperativação, para a ocorrência da reação acrossômica e para a fusão espermatozóide / oócito (AITKEN et al., 1991; DE LAMIRANDE et al., 1993; DE LAMIRANDE; GAGNON, 1993; GRIVEAU et al., 1994; KODAMA et al., 1996; AITKEN, 1997; DE LAMIRANDE et al., 1997; SENGOKU et al., 1998).

ROS são encontrados em baixas concentrações, atuando como mediadores das funções espermáticas normais, entretanto, quando são produzidas em excesso, elas são altamente tóxicas às células espermáticas (MICHAEL et al., 2007).

O mecanismo de ação das ROS na fisiologia normal do espermatozóide ainda não foi completamente elucidado, porém, resultados dos experimentos convergem para a definição de que os processos de hiperativação, capacitação, ligação com a

zona pelúcida e reação acrossômica sejam processos oxidativos ou regulados por redução.

Apesar do efeito fisiologicamente normal das ROS na fisiologia espermática, um desbalanço entre a produção e a eliminação de ROS no sêmen acarreta efeitos prejudiciais ao espermatozóide. A excessiva produção de ROS, também chamada de estresse oxidativo positivo (EOP), é definida como a situação em que há uma mudança no balanço de ROS levando a um efeito pró-oxidativo, que ocorre tanto pelo excesso de ROS como pela diminuição de antioxidantes (DE LAMIRANDE; GAGNON, 1995).

A produção de ROS leva à alterações estruturais do acrossomo, alterações metabólicas, perda irreversível da motilidade, prejuízo da capacidade respiratória, danos ao DNA espermático e redução do potencial fertilizante, pelo comprometimento da capacidade de ligação espermatozóide-oócito (BECONI et al., 1993).

Uma vez que o estresse oxidativo corresponde a um desequilíbrio entre a produção de ROS e a proteção oxidativa no sêmen, torna-se concebível que a avaliação do estresse oxidativo, através da mensuração dos níveis de ROS e/ou dos seus metabólitos, bem como dos níveis de antioxidantes presentes no sêmen seja feita (NICHI, 2003).

4.4.1 Radical superóxido (O_2^-)

O radical superóxido é um radical livre. É formado a partir da adição de um elétron ao oxigênio molecular. Através da cadeia respiratória a sua formação ocorre espontaneamente, em especial na membrana mitocondrial. É um radical pouco reativo, que não tem a habilidade de penetrar membranas lipídicas, agindo portanto, apenas no local onde é produzido (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

Os espermatozóide anormais, ou não funcionais, parecem gerar maiores quantidades de O_2^- , que os espermatozóide saudáveis (MAIA, 2006). A formação excessiva de ROS no sêmen parece ser uma conseqüência da infertilidade (AITKEN, 1995), uma vez que se observa grande quantidade de ROS em homens

inférteis, embora não sejam deficientes em SOD ou catalase no plasma seminal. Portanto o alto nível de ROS, presente no sêmen desses homens inférteis se deve à produção excessiva de ROS e não à deficiências nos sistemas de defesa antioxidante (MAIA, 2006).

4.4.2 Radical hidroxila (OH^\cdot)

O radical hidroxila é considerado o radical livre mais reativo em sistemas biológicos, sendo capaz de causar mais danos que qualquer outro metabólito reativo do oxigênio. Pode ser formado através do peróxido de hidrogênio, em uma reação catalisada por íons metais (Fe^{++} ou Cu^{++}), chamada de reação de Fenton (NORDBERG; ARNÉR, 2001), e através da reação do anion superóxido com o óxido nítrico, que produzirá o anion peroxinitrito (OONO^-), que irá então decompor-se em radical hidroxila e dióxido de nitrogênio (NO_2), conforme Halliwell (1991).

O radical hidroxila também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares, a lipoperoxidação (MAIA, 2006).

4.4.3 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Este não é um radical livre, mas sim um metabólito extremamente deletério do oxigênio (MAIA, 2006), intermediando a reação que produz o radical hidroxila. Possui vida longa e é capaz de atravessar membranas biológicas. Uma vez produzido, o peróxido de hidrogênio é removido por um dos três sistemas enzimáticos antioxidantes, a catalase, a glutathiona redutase e a glutathiona peroxidase (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

4.4.4 Danos causados aos espermatozóides pelas ROS

O espermatozóide é particularmente sensível ao ataque das ROS (JONES; MANN, 1977). Supõe-se que isto ocorra devido à pequena quantidade de citoplasma existente na célula espermática normal, o que limitaria a quantidade de antioxidantes, principalmente os enzimáticos (VERNET et al., 2004).

A produção de altas concentrações de ROS no sêmen está associada com um declínio no metabolismo de energia do espermatozóide, na motilidade e viabilidade espermática e, ainda, com a fragmentação do DNA em homens (ARMSTRONG et al., 1999).

Ao adicionarem 100 μ M de H₂O₂ ao sêmen de bovinos, diluídos em Tris-gema, Bilodeau et al. (2001) observaram um efeito negativo sobre a motilidade espermática.

As grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados da membrana do espermatozóide os tornam um excelente alvo ao ataque dos radicais livres (HALLIWELL; GUTERIDGE, 1999; NORDBERG; ARNÉR, 2001). Ácidos graxos poliinsaturados são aqueles que possuem duas ou mais duplas ligações carbono-carbono (H₂C=CH₂). As ROS atacam estas ligações duplas, insaturadas, o que enfraquece a ligação carbono-hidrogênio. Isto produz uma reação em cadeia, passando pelas etapas de iniciação, propagação e terminação, sendo que a fase de iniciação, da peroxidação lipídica da membrana espermática, começa com o ataque, por qualquer ROS, com reatividade suficiente para seqüestrar um átomo de hidrogênio de um grupo metileno (-CH₂), a um lipídio da membrana. A terminação ocorre lipídicos e peroxila, propagam-se até destruírem a si próprios (MAIA, 2006). Este processo acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade da membrana, com perda da seletividade iônica, liberação do conteúdo das organelas e formação de produtos citotóxicos, levando à morte celular (HALLIWELL; GUTERIDGE, 1999).

4.4.5 Mensuração do estresse oxidativo

O método mais empregado para medir a peroxidação lipídica é o teste do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA). É um método espectrofotométrico empregado para mensurar a concentração dos produtos oriundos da peroxidação dos lipídios (MAIA, 2006). Durante a lipoperoxidação, ocorre um acúmulo de hidroperóxidos de lipídios na membrana espermática, que se decompõe formando vários aldeídos, dentre eles o malondialdeído (MDA), ou substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico – TBARS (SHARMA; AGARWAL, 1996).

Entre os diferentes métodos analíticos estabelecidos, a reação com o ácido 2-tiobarbitúrico - (TBA) é o mais utilizado, sendo que nesta reação, o composto formado pela reação entre o MDA e o TBA pode ser mensurado através de sua absorvância ou fluorescência (NICHI, 2003).

Uma técnica muito empregada na avaliação dos níveis de proteção antioxidante e de peroxidação lipídica é a geração artificial de ROS, o que permitiria avaliar dois aspectos: a peroxidação lipídica espermática e a disponibilidade de hidroperóxidos lipídicos na membrana espermática do espermatozóide, pelos quais iria se iniciar a reação peroxidativa em cadeia, e a habilidade do espermatozóide em inibir a propagação deste processo através de mecanismos antioxidantes (AITKEN et al., 1993), aumentando assim o poder de ensaio com o ácido tiobarbitúrico (GÓES, 2008).

Um dos procedimentos empregados para a produção de ROS, é através da reação entre a hipoxantina e a xantina oxidase, o que resulta em uma redução univalente e bivalente da molécula de oxigênio, com geração do anion superóxido e peróxido de hidrogênio, respectivamente. Estes dois radicais irão originar o radical hidroxila, altamente reativo e deletério ao espermatozóide (AITKEN et al., 1993; GÓES, 2008).

A peroxidação dos lipídios parece ser uma causa particularmente importante de disfunção espermática. Em espermatozoides lipoperoxidados, ocorre a diminuição da fluidez da membrana, com comprometimento da motilidade e morfologia espermática, o que poderia ser controlado ou revertido pelo uso de antioxidantes no meio diluidor (MAIA, 2006).

4.5 ANTIOXIDANTES

Antioxidantes são definidos como quaisquer substâncias que, quando presentes em baixas concentrações, quando comparadas com às de um substrato oxidável, retardam ou previnem significativamente a oxidação deste substrato (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

O plasma seminal possui um mecanismo de proteção contra o estresse oxidativo que compensa a deficiência de enzimas citoplasmáticas no espermatozóide (DONELLY et al., 1999), através de uma série de antioxidantes enzimáticos tais como a superóxido dismutase (ALVAREZ et al., 1987), o sistema glutaciona peroxidase / glutaciona redutase (GPx/GRD), como descrito por Chaudiere et al. (1984) e a catalase (JEULIN et al., 1989). Além destes, existem, no plasma seminal, antioxidantes não enzimáticos, tais como, a taurina e a hipotaurina (ALVAREZ; STOREY, 1983), o α -tocoferol (AITKEN; CLARKSON, 1988), o ascorbato (FRAGA et al., 1991), o piruvato (DE LAMIRANDE; GAGNON, 1992), a glutaciona (LENZI et al., 1994) e o urato (THIELE et al., 1995).

Os antioxidantes exercem um efeito protetor sobre a membrana plasmática de espermatozoides criopreservados, sendo capazes de manter a atividade metabólica e a viabilidade celular (BECONI et al., 1993). Efeitos benéficos da suplementação de antioxidantes tem sido descritos para sêmen de touros pós descongelação (GADEA et al., 2007), para sêmen de cães (HATAMOTO et al., 2006) e em humanos (AITKEN; CLARKSON, 1988).

Com exceção da vitamina E (α -tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maioria dos agentes antioxidantes encontra-se no meio intracelular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A suplementação oral de machos com antioxidantes para a proteção do espermatozóide ainda é especulativa, e depende tanto da exposição do espermatozóide a um estresse oxidativo suficiente para sobrepujar seus mecanismos de defesa, como do aumento dos níveis de antioxidante nos tratamentos reprodutivos e no espermatozóide em si, que a suplementação oral possa causar (TAYLOR, 2001).

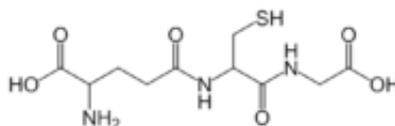
Em humanos, a maioria dos experimentos relacionados ao tratamento para evitar ou diminuir o estresse oxidativo espermático, leva em conta a proteção *in vitro* de

amostras já colhidas visando a aplicação de biotécnicas tais como, fertilização *in vitro* e injeção intra-citoplasmática (AITKEN et al., 1993; GRIVEAU; LE LANNOU, 1994; GRIVEAU et al., 1995; TWIGG et al., 1998; ARMSTRONG et al., 1999; CALAMERA et al., 2001).

Em animais, o tratamento de amostras espermáticas com antioxidantes, como α -tocoferol, ácido ascórbico (vitamina C) e algumas enzimas antioxidantes, também tem sido estudado com resultados diversos. O α -tocoferol atua na membrana plasmática, como um antioxidante lipossolúvel, prevenindo a reação oxidativa em cadeia (MATÈS, 2000). O ácido ascórbico atua na proteção da atividade do citocromo P-450 da destruição por pseudo-substratos e oxigênio (FRAGA et al., 1991). Por sua vez, os antioxidantes enzimáticos atuam em cascata, sendo que a superóxido dismutase provoca a dismutase do ânion superóxido (O_2^-), provocando a formação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Este, por sua vez, pode ser destruído pela catalase ou pela glutathione peroxidase (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989), evitando a formação do radical hidroxila (OH^-), a ROS mais prejudicial (HALLIWELL, 1991).

Um fator importante e possível causa para os diferentes resultados (positivos e negativos) em relação ao tratamento de amostras com antioxidantes seria a quantidade de antioxidante utilizada em cada experimento. Isto ocorre em razão da produção de ROS por espermatozóides ser um processo fisiológico normal, sendo importante para a regulação da taxa de hiperativação, para a ocorrência da reação acrossômica e para a fusão espermatozóide-oócito (AITKEN et al., 1991; DE LAMIRANDE; GAGNON, 1993; GRIVEAU et al., 1994; KODAMA et al., 1996; DE LAMIRANDE et al., 1997; SENGOKU et al., 1998). O mecanismo de ação das ROS na fisiologia normal do espermatozóide ainda não foi completamente elucidado, porém, resultados dos experimentos convergem para a definição de que os processos de hiperativação, capacitação, ligação com a zona pelúcida e reação acrossômica sejam processos oxidativos ou regulados por redução. Sendo assim, uma quantidade excessiva de antioxidantes poderia influenciar negativamente na fertilidade *in vitro* de amostras espermáticas tratadas com antioxidantes. No entanto, uma quantidade ideal poderia incrementar significativamente a qualidade espermática, evitando os danos causados pelas ROS.

4.5.1 Glutationa (L-γ-glutamil-L- cisteinilglicina)



Fonte: Wikipedia

Figura 2- Estrutura molecular da glutaciona*

A glutaciona celular (Figura 2) exerce um papel fundamental em muitos processos biológicos, o que inclui síntese de proteínas e de DNA, e o transporte de aminoácidos, além de ter um papel chave na proteção celular contra a oxidação (IRVINE, 1996).

De acordo com Nichi (2003), as glutacionas peroxidases (GPx) são uma família de enzimas que podem ser divididas em dois grupos, as selênio-dependentes e as selênio independentes. As enzimas do grupo selênio-dependente podem decompor o H_2O_2 em vários hidro ou lipoperóxidos. Nesta reação, catalisada pela glutaciona peroxidase, a glutaciona reduzida (GSH, glutamil-L-cisteinilglicina) é usada como substrato para metabolizar o H_2O_2 , resultando em H_2O e glutaciona oxidada (GSSG). A GSSG, por sua vez, pode ser reduzida novamente para GSH pela enzima glutaciona redutase (GRD), dependente do NADPH (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). O mecanismo catalítico das GPx envolve a oxidação de seu sítio ativo selenolato para ácido selênico. Com a adição de uma molécula de GSH, o ácido selênico é transformado em seleniosulfídio agregado à glutaciona, que pode ser regenerado para o selenonato e glutaciona oxidada (GSSG) pela adição de uma segunda molécula de GSH. Deste modo, duas moléculas de GSH são oxidadas para GSSG que, subseqüentemente, podem ser reduzidas pela glutaciona redutase, a enzima redutora de GSSG mais abundante em mamíferos (NORDBERG; ARNÈR, 2001).

As glutacionas selênio-dependentes podem ser divididas em quatro formas geneticamente distintas, GPx1, GPx2, GPx3 e GPx4. A GPx2 é encontrada no citosol e a GPx3, no meio extracelular, e são pouco detectadas na maioria dos tecidos, exceto trato gastrointestinal e rins. A GPx1 e a GPx4 são localizadas na maioria dos tecidos estando a GPx1 restrita às mitocôndrias e a GPx4 ao citosol e à

* Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org/wiki/Glutaciona>>
Acesso em: 20 Setembro 2009

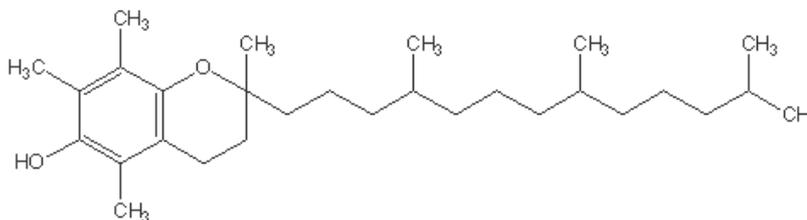
membrana (MATÈS, 2000). A GPx1 provoca a redução de hidroperóxidos de ácidos graxos e H₂O₂ utilizando a GSH. Já a GPx4 pode reduzir diretamente hidroperóxidos de fosfolípidos, de ácidos graxos e de colesterol, que são produzidos em membranas peroxidadas e lipoproteínas oxidadas (IMAI et al., 1998). A GPx1 é predominantemente presente em eritrócitos, rins e fígado e a GPx4 é altamente expressa nas células epiteliais renais e nos testículos (NICHI, 2003).

Após a ejaculação, os espermatozóides são normalmente protegidos pelo sistema antioxidante presente no plasma seminal, sendo rapidamente separados dos leucócitos presentes no plasma, e do seu potencial oxidativo, pela migração através do muco cervical (IRVINE, 1996). Por outro lado, na preparação do sêmen para uso em reprodução assistida, o plasma seminal é removido, o que aproximaria espermatozóide e leucócitos, o que se agrava pela ausência do mecanismo antioxidante do plasma e pela presença de íons metálicos de transição (AITKEN et al., 1992).

Foi observado um aumento no percentual de motilidade espermática pós-congelação, após adição de 5µM de glutathione ao sêmen de caprinos (SINHA et al., 1996). Houve aumento da motilidade e diminuição na porcentagem de anormalidades acrossômicas, no sêmen descongelado. A taxa de fertilidade do sêmen congelado na presença de glutathione foi maior, mas não significativamente, do que aquela observada para o sêmen congelado apenas em Tris.

Ao testar o efeito de tratamentos antioxidantes com diferentes concentrações de glutathione reduzida, adicionada aos diluidores Tris-gema-citrato, Earle®TCM199, HAM F10®, sobre os parâmetros motilidade vigor, Índice de Motilidade Espermática, porcentagem de espermatozóides com membrana espermática íntegra, porcentagem de espermatozóides com atividade mitocondrial classes II, III e IV e porcentagem de espermatozóides com acrossomo íntegro, de amostras de sêmen de gato do mato pequeno (*Leopardus tigrinus*), mantidas sob refrigeração a 4°C, coletadas por eletroejaculação, Barros (2007) observou que as diferentes concentrações de glutathione não influenciaram motilidade, vigor, IME, integridade de membrana plasmática dos espermatozóides e porcentagem de espermatozóides Classes II, III e IV, na avaliação de atividade mitocondrial, mas os resultados indicaram um efeito protetor da glutathione na membrana acrossomal, para o diluidor TCM.

4.5.2 α - tocoferol (Vitamina E)



Fonte: MAIA (2006)

Figura 3 - Estrutura molecular da vitamina E (α -tocoferol)

Um importante sistema de proteção contra os danos oxidativos é a vitamina E (Figura 3). Ela é um componente lipofílico que não apenas destrói os radicais de oxigênio do interior da membrana assim como intercepta os radicais peroxil lipídicos que parecem ser importantes na propagação da reação em cadeia da peroxidação lipídica (ALMEIDA; BALL, 2005).

Vitamina E é um termo nutricional que refere-se a um grupo de tocoferóis e tocotrienóis com atividade antioxidante. Somente oito moléculas naturais apresentam atividade antioxidante, sendo quatro tocoferóis (α , β , γ , δ) e quatro tocotrienóis (α , β , γ , δ), segundo Halliwell e Gutteridge (1999).

No processo de maturação, ocorre uma perda citoplasmática no espermatozóide. Em conseqüência, os mecanismos endógenos de reparo, bem como as defesas enzimáticas, são prejudicados. O ataque pelas ROS ao espermatozóide pode ser evitado pelas enzimas e moléculas presentes no plasma seminal, como a vitamina E (BARROS, 2007)

O efeito protetor da vitamina E para minimizar os efeitos deletérios do estresse oxidativo no sêmen pode ser explicado pela diminuição da lipoperoxidação da membrana (HATAMOTO et al., 2006).

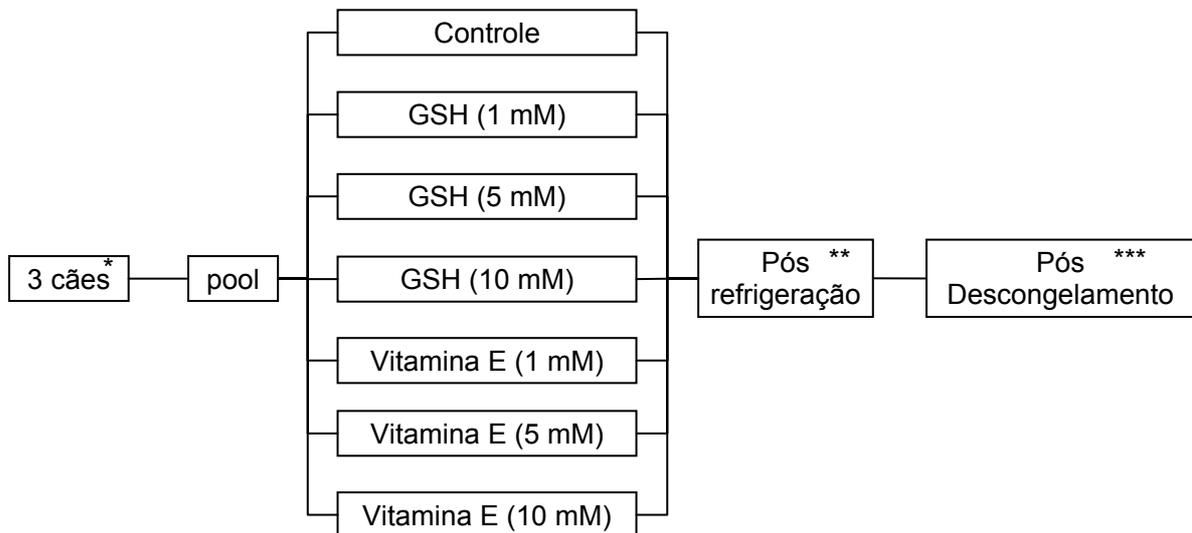
Ao oxidar-se, a vitamina E interrompe a reação em cadeia da peroxidação lipídica de biomembranas e lipoproteínas (BARROS, 2007)

MATERIAIS E MÉTODOS

5 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi realizado no 2º Batalhão de Polícia do Exército e no Laboratório de Andrologia do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo. As atividades foram realizadas no período compreendido nos anos de 2008 e 2009.

5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



*: motilidade >70%;

**.: Avaliação de motilidade e vigor;

***: Avaliação de motilidade, vigor, % de espermatozoides com membrana íntegra (vivos), % de espermatozoides com acrossomo íntegro (Pope), atividade mitocondrial através da coloração diaminobenzidina (DAB I: todas as mitocôndrias ativas; DAB IV: nenhuma mitocôndria ativa) e susceptibilidade dos espermatozoides ao estresse oxidativo

Figura 4 - Figura representando o esquema de delineamento

5.2 LOCAL

O experimento foi conduzido no Laboratório de Andrologia Animal do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, situado no município de São Paulo e nas instalações da Seção de Cães de Guerra do 2º Batalhão de Polícia do Exército (Figura 5), latitude 23°30'25" S e longitude 46°47'29" W, situados no município de Osasco, ambos os municípios no estado de São Paulo.



Figura 5 - Vista das instalações da SecCG do 2º BPE – local das colheitas de sêmen.

5.3 DILUIDORES

A maioria dos pesquisadores tem utilizado o diluente Tris, que tem mostrado superioridade em relação à outros diluentes (SILVA, 2005). Tris (Tris-hidroximetilaminometano - $H_2NC(CH_2OH)_3$) é uma substância facilmente solúvel em água, e disponível comercialmente, com um alto grau de pureza, na forma de cristais. Ele

permanece estável em temperatura ambiente por diversos meses e é conhecido por não inibir diversos sistemas enzimáticos (BATES, 1962, apud SILVA, 2005).

A atividade metabólica do espermatozóide resulta na formação de íons H^+ , que poderiam levar à acidificação do meio. Assim, faz-se necessário um mecanismo para a remoção desses íons, uma vez que a diminuição de pH poderia levar a uma redução da longevidade e da capacidade fertilizante da célula espermática (ENGLAND, 1993). Nesse sentido, Davis e colaboradores, segundo SILVA (2005), foram os primeiros a descrever a utilização do tampão Tris para a conservação do sêmen de um mamífero, no caso, bovinos. Já no ano seguinte à comunicação de Davis, foi adaptado o uso do diluente à base de tampão Tris, associado ao citrato, para a preservação do sêmen na espécie canina (FOOTE, 1964). Desde então, o Tris tornou-se o diluente mais utilizado para a congelação do sêmen canino.

Para o preparo do diluente Tris, usualmente, realiza-se a adição de uma hexose ($C_6H_{12}O_6$), como uma fonte exógena de substrato energético para o espermatozóide (ENGLAND, 1993). A célula espermática dos mamíferos é capaz de obter a energia necessária para a manutenção de sua motilidade através da via glicolítica (SILVA, 2005). Sabe-se que o plasma seminal da espécie canina, normalmente, não possui grandes quantidades dos açúcares frutose e glicose. Entretanto, foi demonstrado que esses açúcares atuam em mecanismos diferentes na célula espermática, sendo que a frutose propicia uma motilidade mais rápida e linear (RIGAU et al., 2001, apud SILVA, 2005).

O ácido cítrico (ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico - $C_6H_8O_7$) é outra substância que entra na composição do diluente Tris. No caso do diluente Tris, a forma utilizada é a monohidratada (SILVA et al., 2002). Por sua conhecida ação anti-oxidante, o ácido cítrico tem sido utilizado como um conservante natural. Em bioquímica, é marcada a sua atuação no ciclo de Krebs, importante via da respiração celular que ocorre nas mitocôndrias. Além disso, em algumas soluções, o ácido cítrico é capaz de servir como doador de prótons, produzindo o citrato, que é largamente conhecido por atuar na estabilização de pH (SILVA, 2005).

A gema de ovo de galinha tem sido adicionada ao tampão Tris para proteger a membrana plasmática, restaurando os fosfolipídios perdidos durante o choque térmico,

durante o resfriamento inicial do sêmen. Durante o choque térmico, as lipoproteínas interagem com a estrutura lipídica da membrana plasmática das células espermáticas e propiciam a proteção (BOUCHARD et al., 1990). Para a preservação do sêmen canino, várias concentrações de gema de ovo tem sido utilizada. Visto que a mesma também possui uma capacidade tamponante, sua quantidade no meio varia de acordo com a capacidade dos outros componentes do diluente também agirem como tampões. Nesse contexto, a maioria dos autores utiliza concentrações de gema em torno de 20% no diluente (LINDE-FORSBERG; FORSBERG, 1989; SILVA, 2005).

Segundo Peña (2000), o SDS é um detergente aniônico do grupo alquil, cujo efeito protetor sobre a célula espermática não está ainda totalmente compreendido. Porém, acredita-se que ele solubilize as lipoproteínas da gema de ovo e aumente deste modo seu potencial de proteção à célula espermática. Esse mesmo autor alertou ainda para o fato de que uma exposição prolongada dos espermatozoides ao SDS poderia conferir um excesso de fluidez à sua membrana plasmática.

Para se obter sucesso com a criopreservação de sêmen, faz-se necessária ainda a adição de substâncias denominadas crioprotetores, cuja presença melhora os índices de sobrevivência celular após os processos de congelação e descongelação. Os agentes crioprotetores pertencem a dois grupos: 1) aqueles que penetram nas células, como o glicerol, o dimetilsulfóxido (DMSO), o etileno-glicol e o metanol; 2) aqueles que permanecem no meio extracelular, como as proteínas, os açúcares e o polivinil-pirrolidona (ENGLAND, 1993).

O glicerol ($\text{CH}_3\text{H}_8\text{O}_3$), um álcool polihídrico altamente permeável, é o crioprotetor mais empregado na congelação de sêmen nas diferentes espécies (SILVA et al., 2003). Esta substância possui a capacidade de penetrar através das membranas celulares. Sabe-se que o mesmo inicialmente ocasiona um estresse osmótico à célula espermática, impedindo a formação de grandes cristais de gelo intracelulares (WATSON, 2000).

O glicerol pode ainda contribuir para a alteração das propriedades da membrana celular através da indução de modificações na estabilidade da sua estrutura lipídica e de alterações na sua permeabilidade à água. A capacidade de fusão da membrana e sua resposta ao sinal de transdução poderiam ser também afetadas,

contribuindo para a redução da longevidade e aceleração da capacitação espermática (WATSON, 1995).

Foram preparados 500 mL de diluidor Tris-frutose-ácido cítrico, cuja fórmula encontra-se no Anexo 1.

O total de volume do diluidor foi dividido em duas frações de igual volume, à uma delas foi adicionado 10% de glicerol(v:v) para que na diluição final, na proporção de 1:1 a concentração fosse igual a 5%(v:v).

Da solução inicial foram feitos os diluidores contendo glutathione e vitamina E, nas concentrações de 0 mM, 1 mM, 5 mM e 10 mM da seguinte maneira:

Fez-se uma solução 10 mM com a adição de 0,30733 g de glutathione em 50 mL. A solução de 5 mM foi feita adicionando-se 30 mL de solução 10 mM com 30 mL de solução mãe. Finalmente a solução de 1mM foi feita com a adição de 5mL da solução de 10 mM a 45 mL da solução estoque. O mesmo foi feito com o diluidor contendo o glicerol.

5.4 CÃES

Foram disponibilizados doze cães militares de trabalho, das raças rottweiler, doberman, pastor alemão e pastor belga, todos da Seção de Cães de Guerra do 2º Batalhão de Polícia do Exército (Figura 6), comprovadamente férteis e com sorologia negativa para brucelose e leptospirose. Estes cães tinham a idade média de 4 anos e peso médio de 30 Kg, e são submetidos aos protocolos de vacinação e vermifugação preconizados pela Seção de Remonta e Veterinária, do Comando Logístico do Exército Brasileiro.

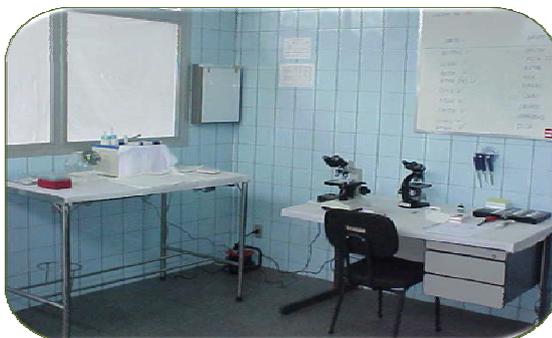


Figura 6 - Cães militares utilizados no experimento

5.5 COLHEITA DE SÊMEN E COMPOSIÇÃO DO *POOL*

No dia anterior à colheita, eram sorteados os animais que iriam compor cada um dos três *pools*. Dos animais disponibilizados, três grupos de três cães eram aleatoriamente formados, obtendo-se desta forma quatro *pools* com três ejaculados cada. Assim, nove animais eram utilizados para a colheita de sêmen, reservando ainda três animais, para qualquer intercorrência.

Antes de iniciar a colheita, era preparada a enfermaria veterinária da Seção de Cães de Guerra do 2º BPE, montando-se os equipamentos e disponibilizando os meios necessários aos procedimentos (Figuras 7 e 8).



Figuras 7 e 8- Equipamentos montados para a execução do experimento

Enquanto aferiam-se os dados, como temperatura dos equipamentos, ordem de colheita e composição dos *pools*, os cães eram levados para higienização, rasqueamento, inspeção e passeio, onde eram levados a urinar, evitando assim a contaminação dos ejaculados por urina. Após esse procedimento os animais eram conduzidos à sala de colheita onde realizava-se o procedimento de colheita de sêmen (Figuras 9 e 10).



Figuras 9 e 10 - Procedimento de colheita de sêmen

Imediatamente após a obtenção do ejaculado, o mesmo era observado para detecção de alguma anormalidade perceptível macroscopicamente, como presença de sangue ou urina e alterações de coloração.

Para a composição do *pool*, foram utilizadas apenas amostras com motilidade espermática igual ou superior a 70% e vigor espermático de valor igual ou superior a 3. Caso o ejaculado de algum animal não apresentasse estes valores mínimos propostos, o doador de sêmen em questão, era substituído por outro animal, dentro do lote de animais que estavam disponibilizados em reserva.

O sêmen foi colhido por manipulação digital, com o animal em estação (SEAGER; PLATZ, 1977; JOHNSTON, 1991; VANUCCHI et al, 1998; BAPTISTA

SOBRINHO, 2002) em material pré-aquecido, composto de tubo cônico de centrifuga, graduado em mililitros, imerso em mamadeira com água a 37° C para manter o sêmen aquecido, protegida contra choques físicos e luz e funil de vidro, sem a presença de fêmea no cio (SEAGER; PLATZ, 1977; BAPTISTA SOBRINHO, 2002; HATAMOTO et al., 2006).

Os ejaculados dos animais pertencentes ao mesmo *pool*, considerado como unidade experimental, eram acondicionados e homogeneizados em criotubos. No total foram realizadas quatro colheitas, totalizando doze *pools*.

5.6 ANALISE DO SÊMEN

Imediatamente após a colheita, o sêmen foi analisado quanto ao volume seminal e 20 µL foram colocados entre lâmina e lamínula, pré-aquecidas a 37°C em placa aquecedora, para mensuração da motilidade e vigorespermático, em microscópio de luz, com platina aquecida.

Conforme a proporção de espermatozóides móveis nos campos de observação, a motilidade espermática foi classificada, numa escala subjetiva de 0 a 100%, onde 0% corresponderia a nenhum espermatozóide móvel, e 100% corresponderia a todos os espermatozóides com movimentação.

Para a análise da concentração, 10µl cada amostra descongelada foi adicionado em 1.990 µl de solução de formaldeído salino, para efetuar a contagem em câmara de Neubauer.

As análises imediatas, como volume, coloração, motilidade e vigor, foram feitas na enfermaria veterinária da Seção de Cães de Guerra do 2º BPE, enquanto que os exames laboratoriais foram feitos no Laboratório de Andrologia, do Departamento de Reprodução Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade de São Paulo

5.7 CONGELAÇÃO DO SÊMEN

Diversas metodologias têm sido descritas para a congelação do sêmen de cães e variam de acordo com o diluente, protetores de resfriamento e agentes crioprotetores empregados, preconizando o uso de diferentes velocidades de congelação.

Com o diluidor previamente preparado com quatro concentrações diferentes de glutathiona reduzida (GSH): 0mM (controle), 1 mM, 5 mM e 10 mM e quatro concentrações diferentes de vitamina E: 0mM (controle), 1 mM, 5 mM e 10 mM, foram as alíquotas de cada pool distribuídas nos criotubos, que foram submetidos à refrigeração, obedecendo uma curva de $-0,2^{\circ}\text{C}$ por minuto, até atingirem a temperatura de 4°C . Isto foi feito acondicionando as amostras em uma bandeja levada a um refrigerador com controle e acompanhamento térmico por termômetro digital de máxima e mínima.

Ao término deste período foi adicionado o mesmo volume de diluidor com glicerol e em seguida as amostras ficaram por mais 60 minutos sob refrigeração.

O sêmen foi envasado em palhetas devidamente identificadas, com capacidade de 0,5 mL, e vedadas com álcool polivinílico. Em seguida, foram submetidas a uma pré congelação com vapor de nitrogênio por 20 minutos, até o patamar de -70°C . Depois disso, as palhetas, devidamente raqueadas, foram submersas em nitrogênio líquido (-196°C) armazenadas em botijão criogênico.

5.8 DESCONGELAÇÃO DO SÊMEN

De maneira análoga ao processo de congelação espermática, existem vários protocolos preconizando diferentes temperaturas e velocidades de descongelação para o sêmen canino .

A descongelação das amostras foi feita por imersão de duas palhetas, correspondentes a cada tratamento, em água à 37°C por 30 segundos; após este

período, a palheta foi retirada e seca, com auxílio de papel toalha, seccionada na extremidade em que foi vedada, e a motilidade e o vigor do sêmen foram analisados de forma rotineira.

5.9 TESTES CONVENCIONAIS

Os testes convencionais, utilizados neste experimento, foram motilidade retilínea progressiva e o vigor espermático.

5.9.1 Avaliação da motilidade espermática

Motilidade retilínea progressiva, ou simplesmente motilidade, é a capacidade do espermatozóide movimentar-se em linha reta, refletindo indiretamente a capacidade e viabilidade do espermatozoide em fertilizar o óvulo (FELDMAN; NELSON, 1996).

Este parâmetro seminal deve ser avaliado imediatamente após a colheita, depositando-se uma gota do sêmen entre lâmina e lamínula, limpas e previamente aquecidas a 37°C (FELDMAN; NELSON, 1996; VANNUCCHI et al., 1998).

A motilidade é classificada subjetivamente, numa escala entre 0 e 100%, segundo a proporção de espermatozóides móveis nos campos observados, sob aumento de 100 vezes em microscópio convencional, sendo: 0% para nenhum espermatozóide móvel no campo, e 100% para todos os espermatozóides móveis.

Uma amostra de sêmen normal deve possuir motilidade igual ou superior a 70% (VANNUCCHI et al., 1998).

Para este estudo, todos os animais que compunham o pool apresentaram motilidade superior a 70%.

5.9.2 Avaliação do vigor espermático

O vigor espermático, ou velocidade de progressão espermática, foi avaliado baseado no movimento progressivo linear dos espermatozóides, numa escala subjetiva de 0 a 5, na qual, 0 representa ausência de movimento, e, 5 sugere rápida mobilidade dos espermatozóides através do campo (VANNUCCHI et al., 1998). Este parâmetro não é freqüentemente descrito na literatura, porém a sua avaliação é sugerida como uma complementação aos dados de motilidade. Cães normais devem apresentar vigor dos espermatozóides superior a 3.

Para este estudo, todos os animais utilizados apresentaram vigor espermático superior a 3.

5.10 TESTES FUNCIONAIS

5.10.1 Avaliação da integridade acrossomal

Visando monitorar os possíveis danos causados durante o resfriamento das amostras, a técnica da Coloração Simples *Fast-Green/Rosa-Bengala* foi utilizada para a avaliação do acrossoma (POPE; ZHANG; DRESSER, 1991).

Para tanto, uma alíquota de cada amostra (5 µl) foi adicionada ao Corante Simples de Pope (5 µl), sendo a mistura incubada por 70 segundos em mesa aquecida à 37°C. Após a incubação, foram feitos esfregaços sobre lâminas de microscopia, os quais foram analisados em microscópio convencional sob aumento de 1250 vezes. Foram contadas 200 células por lâmina, classificadas como:

Acrossomo Íntegro: região acrossomal de coloração lilás, levemente mais escura que a região pós-acrossomal;

Acrossomo Não-Íntegro: região acrossomal de coloração rosa, levemente mais clara que a região pós-acrossomall.

5.10.2 Avaliação da integridade da membrana plasmática

Para a avaliação da integridade da membrana plasmática, foi utilizada a coloração de Eosina-Nigrosina (E/N) segundo Barth e Oko (1989). Nesta coloração, por alterações na permeabilidade das membranas dos espermatozóides, a eosina cora estas células de rosa. Os espermatozóides com membranas íntegras não permitem a entrada do corante, portanto, contrastando com o plano de fundo tomado pela coloração escura da nigrosina, as células aparecem brancas. Desta maneira, uma alíquota de sêmen (5 µl) foi misturado ao corante, na proporção de 1:1, e realizados esfregaços sobre lâminas de microscopia. As lâminas foram analisadas em microscópio convencional sob aumento de 1250 vezes. Foram contadas 200 células por lâmina, classificadas como células com membrana íntegra (não coradas) e não-íntegra (coradas).

5.10.3 Avaliação da atividade mitocondrial

Segundo Hrudka (1987), a enzima Citocromo C-Oxidase (CCO) tem um papel fundamental no processo de respiração celular e metabolismo energético das células, além disso, é pré-requisito para as funções osmótica e sintética, motilidade e manutenção da estrutura celular. A técnica citoquímica desenvolvida por este autor é baseada na oxidação da 3,3'-diaminobenzidina (DAB) pelo Complexo Citocromo C, o que inclui a CCO, através de uma reação em cadeia na qual o reagente é polimerizado e se deposita nos locais onde ocorre a reação, ou seja, se restringe à mitocôndria. Esta deposição pode ser identificada através de microscopia convencional pela sua

coloração marrom. Desta maneira, é possível descrever o declínio espontâneo da CCO ocasionado por tratamentos físicos e/ou químicos aos que os espermatozoides são submetidos.

Para realização desta técnica, uma alíquota de 25µL de amostra foi incubada com 25µL de DAB (1mg/ml de PBS), a 37°C, por uma hora. Também era feito um controle negativo com duração e condições idênticas, tendo sido previamente adicionado formol salino para inibir sua atividade mitocondrial. Após incubação, foram feitos esfregaços em lâmina de vidro e estas fixadas em formol a 10 por 10 minutos. As lâminas foram então lavadas e secas no ar sob proteção da luz.

A atividade citoquímica da mitocôndria espermática foi avaliada segundo descrito por Hrudka (1987). Desta maneira, as lâminas foram observadas em microscópio de contraste de fase, sob aumento de 1000 vezes, em imersão. Foram contados 200 espermatozoides/lâmina, e classificados de acordo com o grau de coloração da peça intermediária em 4 classes:

- *Classe I*: células espermáticas com peça intermediária totalmente corada, alta atividade mitocondrial (DAB I);
- *Classe II*: células espermáticas com segmentos corados (ativos) e não-corados (inativos), havendo predominância dos ativos (DAB II);
- *Classe III*: células espermáticas com segmentos corados (ativos) e não-corados (inativos), havendo predominância dos inativos (DAB III);
- *Classe IV*: células espermáticas com peça intermediária totalmente descorada, sem atividade mitocondrial (DAB IV).

5.11 PROVA BIOQUÍMICA

Este trabalho utilizou, como prova bioquímica, a avaliação do índice de resistência ao estresse oxidativo.

5.11.1 Avaliação do Índice de Resistência ao Estresse Oxidativo

A prova bioquímica, para avaliação do índice de resistência ao estresse oxidativo seguiu a descrição abaixo.

Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARs

O primeiro passo da seqüência para a análise da resistência dos espermatozóides ao estresse oxidativo, por meio da dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, foi verificar a motilidade e vigor de cada amostra dos *pools* de sêmen com suplementação de selênio e sem suplementação de selênio.

Após esses exames foi aferida a concentração espermática e então através de uma regra de três foi ajustado e padronizado o número de 30 milhões de espermatozóides/ml, para serem submetidos à prova do TBARS.

As determinações basearam-se na metodologia descrita por OHKAWA; OHISHI; YAGI (1979) que tem como fundamento a reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico com uma molécula de malondialdeído (MDA), produzindo um complexo de coloração rósea, que é quantificado através de espectrofotometria num comprimento de onda de 532 nanômetros (nm). Esta reação ocorre à temperatura entre 90 e 100°C, em pH ácido.

Com o ajuste de uma quantidade fixa de espermatozóides para todos os tratamentos, acrescentou-se à amostra solução fisiológica a 0,9%, chegando ao volume diluído de 1,0ml.

Adicionou-se a essa amostra diluída 250µl de ácido ascórbico e 250µl de sulfato ferroso, que agiram como um sistema gerador de ROS. Da amostra preparada (1,5ml), foram retirados 500µl e depositados em um tubo eppendorf de 1,5ml acrescentado a 250µl de formol salino para nova averiguação da concentração para equiparar com a concentração calculada anteriormente. O restante da amostra (1,0ml) ficou incubado

em banho-maria a 37°C durante 1 hora e 30 minutos para a geração de espécies reativas ao oxigênio (ROS).

Após o período de incubação, adicionou-se 2,0ml de solução de ácido tricloroacético a 10% (TCA 10%), previamente mantido a 5°C, e a amostra foi centrifugada durante 15 minutos a 5000 rpm, para a precipitação de proteínas.

Terminado o processo de centrifugação, o sobrenadante foi retirado através de pipeta automática, acondicionado em criotubos identificados e em seguida, congelados em botijão de nitrogênio líquido.

Para a análise de TBARs, adicionou-se em tubos de ensaio, 500µl das amostras previamente descongeladas a 500µl de ácido tiobarbitúrico a 1% (TBA 1%)², dissolvido em hidróxido de sódio (NaOH) 0,05N³; preparado instantes antes de ser utilizado.

Alíquotas de 500µl do sobrenadante foram colocadas em tubos de ensaio juntamente com 500µl de TBA 1%, incubadas em banho fervente (90-100°C) por 15 minutos e resfriadas em banho de gelo (0°C) para cessar a reação.

Os TBARs foram quantificados em espectrofotômetro⁴ em um comprimento de onda de 532nm, sendo os resultados comparados com uma curva padrão, feita previamente com malondialdeído (MDA)⁵.

O MDA é uma das principais substâncias que reage com o ácido tiobarbitúrico e a concentração dos TBARs é determinada utilizando-se o valor $1,56 \times 10^5 \times M^{-1} \text{ ml}^{-1}$ como coeficiente de extinção molar do MDA, sendo que a resistência à peroxidação lipídica no sêmen se expressa em nanogramas de TBARS/ml de sêmen.

5.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pelo programa Statistical Analysis System for Windows (SAS), versão 9.3.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2000).

² Sigma T 5500

³ Sigma S 8045

⁴ Ultrospec 3300pro, Amersham Pharmacia

⁵ Sigma 10,838-3

Pelo aplicativo Guided Data Analysis, os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. Caso não obedecessem a estas premissas eram transformados (logaritmo na base 10 - $\text{Log}_{10}X$; Raiz quadrada - RQ X; Quadrado - X^2) e se a normalidade não fosse obtida empregava-se então, o procedimento NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica (teste de Kruskal Wallis para interação e teste de Wilcoxon para efeito do grupo). Os dados que obedeceram às premissas foram analisados através do teste LSD e do teste t de Student para efeito de interação e para efeito do grupo, respectivamente.

Para descrição dos resultados foram empregados as médias e respectivos erros padrões (média \pm erro padrão da média) e os níveis de significância (p) dos dados originais (quando obedecessem às premissas), dos dados transformados (quando necessária a transformação) e dos dados analisados pela análise não paramétrica (quando não obedecessem às premissas e não houvesse transformação possível).

O nível de significância utilizado para rejeitar H_0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se que houve diferenças significativa entre as variáveis classificatórias (afetado/controle) para uma determinada variável resposta.

As variáveis resposta foram analisadas pela correlação de Pearson e Spearman, para variáveis paramétricas e não paramétricas, respectivamente. Os resultados foram expressos pelo do coeficiente de correlação (r) e seu nível de significância (p).

Neste experimento a variável classificatória utilizada foi a suplementação com vitamina E e GSH ao sêmen. As variáveis resposta utilizadas foram motilidade, vigor, % de espermatozoides com membrana íntegra (vivos), % de espermatozoides com acrossomo íntegro (Pope), atividade mitocondrial através da coloração diaminobenzidina (DAB I: todas as mitocôndrias ativas; DAB IV: nenhuma mitocôndria ativa) e susceptibilidade dos espermatozoides ao estresse oxidativo.

Para o efeito do tratamento com Vitamina E, as variáveis motilidade, % de espermatozóides com membrana íntegra, % de espermatozóides com acrossomo íntegro obedeceram às premissas após a transformação para logaritmo na base 10. As variáveis Vigor, % de espermatozóides DAB I, % de espermatozóides DAB II e TBARS obedeceram às premissas não sendo necessária qualquer transformação. A variável % de espermatozóides DAB III obedeceu às premissas após remoção de dois outliers. A variável % de espermatozóides DAB IV não obedeceu às premissas, não sendo possível transformá-la. Esta variável foi então analisada pelo PROC NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica.

Na análise do efeito do GSH, as variáveis motilidade, % de espermatozóides com acrossomo íntegro e % de espermatozóides DAB IV obedeceram às premissas após a transformação para logaritmo na base 10. As demais variáveis obedeceram às premissas não sendo necessária qualquer transformação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados das análises das amostras colhidas para o experimento estão apresentados nas tabelas abaixo.

6.1 EFEITO DO TRATAMENTO COM GSH

Os resultados referentes ao efeito do tratamento antioxidante com GSH estão apresentados nas tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1 -Efeito do tratamento com diferentes concentrações de GSH (1mM, 5mM e 10mM) em sêmen canino refrigerado (1 hora) sobre a motilidade e vigor espermáticos - Osasco - 2009.

	Concentração de GSH			
	controle	1 mM	5 mM	10 mM
Motilidade (%)	75,42 ± 3,45	79,58 ± 3,40	76,67 ± 3,16	71,67 ± 4,41
Vigor (1-5)	2,92 ± 0,16	3,04 ± 0,20	2,96 ± 0,16	2,67 ± 0,15

^{a, b} Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas (LSD, p<0,05)

Tabela 2 - Efeito do tratamento com diferentes concentrações de GSH (1mM, 5mM e 10mM) em sêmen canino criopreservado sobre a motilidade e vigor espermáticos, integridade de acrossomo (Pope), integridade de Membrana Plasmática (vivos) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) – Osasco - 2009

	Concentração de GSH			
	controle	1 mM	5 mM	10 mM
Motilidade (%)	17,33 ± 5,92	23,87 ± 7,31	21,78 ± 6,78	21,67 ± 7,73
Vigor (1-5)	2,28 ± 0,39	2,56 ± 0,37	2,78 ± 0,26	2,94 ± 0,19
Pope (%)	54,58 ± 7,76	53,79 ± 7,63	55,92 ± 6,54	57,42 ± 5,53
Vivos (%)	6,21 ± 1,16 ^a	11,21 ± 2,84 ^b	8,79 ± 0,82 ^{ab}	8,50 ± 1,15 ^{ab}
TBARS (ng/10 ⁶ spz)	893,6 ± 76,7	902,4 ± 78,5	1071,6 ± 115,3	984,46 ± 85,5

^{a, b} Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas (LSD, p<0,05)

Tabela 3 - Efeito do tratamento com diferentes concentrações de GSH (1mM, 5mM e 10mM) em sêmen canino criopreservado sobre a atividade mitocondrial espermática (DAB 1 = atividade total; DAB IV = inativa) – Osasco - 2009

	Concentração de GSH			
	controle	1 mM	5 mM	10 mM
DAB I (%)	60,14 ± 3,98	55,81 ± 5,61	58,53 ± 4,82	51,60 ± 4,30
DAB II (%)	26,74 ± 3,55	28,93 ± 4,02	30,97 ± 4,81	33,90 ± 4,24
DAB III (%)	8,62 ± 1,05 ^{ab}	9,64 ± 1,85 ^{ab}	6,80 ± 1,07 ^a	11,60 ± 1,69 ^b
DAB IV (%)	4,49 ± 0,98 ^a	5,61 ± 1,15 ^a	3,50 ± 0,46 ^{ab}	2,90 ± 0,79 ^b

^{a, b} Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas (LSD, p<0,05)

Diversos estudos indicam que uma das principais razões para a perda da qualidade espermática durante a criopreservação de sêmen seria o estresse oxidativo (MAZZILLI et al, 1995; WANG et al, 1997; THOMSON et al., 2009; ZRIBI et al., 2009). No entanto, não se sabe ainda em que momento efeito deletério das espécies reativas de oxigênio é mais evidente, isto é, se o mesmo ocorre durante o tempo de refrigeração ou no momento da congelação. Assim, no presente estudo, o sêmen foi submetido à análise após o tempo de refrigeração com a finalidade de verificar a perda de qualidade espermática durante este período. Na tabela 1 podemos verificar que nenhuma das concentrações utilizadas de GSH apresentou efeito significativo sobre a motilidade e vigor espermáticos. Estes resultados indicam que, provavelmente, os danos oxidativos que ocorrem durante o tempo de refrigeração não seriam significantes. No entanto, mais estudos são necessários para verificar esta hipótese, sendo necessária a avaliação do status oxidativo do sêmen durante este período.

Da mesma forma, ao verificar os resultados após o descongelamento, o tratamento com GSH não apresentou efeito sobre a motilidade, o vigor, a porcentagem de espermatozoides com acrossomo íntegro, e a susceptibilidade dos espermatozoides ao estresse oxidativo (TBARS). No entanto, verificou-se efeito positivo significativo do tratamento com 1 mM de GSH na porcentagem de células com membrana íntegra, quando comparado ao controle. Da mesma forma, o tratamento com 10 mM de GSH foi benéfico em relação à porcentagem de espermatozoides com mitocôndrias inativas (DAB IV), isto é, uma menor porcentagem destas células nas amostras tratadas com esta concentração quando comparadas com o controle e a concentração 1 mM (Tabela 3). De forma similar, verificou-se um efeito benéfico do GSH, agora na concentração de 5 mM, sobre a porcentagem de células com lesão severa de mitocôndrias (DAB III).

O GSH é considerado por alguns autores como o mais importante antioxidante celular (ANDERSON, 1998; WU et al., 2004). A principal atividade desta substância como antioxidante é a destruição do peróxido de oxigênio através de reação enzimática, tendo como catalisador a glutathione peroxidase. Nesta reação, o GSH é oxidado para a formação da glutathione oxidada (GSSG), que por sua vez é então reduzida para sua forma original através da enzima NADPH-dependente glutathione reductase (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989; XIAO et. al, 2002). Os resultados do

presente experimento confirmam esta hipótese para o sêmen de cães visto que verificou-se um efeito benéfico do GSH para a atividade mitocondrial. No entanto, o tratamento com GSH foi benéfico também em relação à membrana plasmática, sendo que provavelmente, este antioxidante pode ser importante também no meio extracelular.

Outra hipótese para explicar os resultados encontrados no presente estudo seria a quantidade de GSH utilizado. Sabe-se que a produção de ROS por espermatozóides é um processo fisiológico normal, sendo importante para a regulação da taxa de hiperativação, para a ocorrência da reação acrossômica e para a fusão espermatozóide / oócito (AITKEN et al., 1991; DE LAMIRANDE; GAGNON, 1993; GRIVEAU et al., 1994; KODAMA et al., 1996; DE LAMIRANDE et al., 1997; SENGOKU et al., 1998). Assim, a presença de uma quantidade moderada de espécies reativas de oxigênio é necessária. Desta forma, o tratamento com antioxidantes em quantidade excessiva pode levar a efeitos deletérios nestes eventos fisiológicos, como observou-se em experimentos com suplementação oral de vitaminas E e C, β -caroteno e selênio (HERBERT, 2007; SEIFRIED et al., 2007). Evidentemente, para que o tratamento antioxidante seja eficiente é necessário que o sistema biológico estudado esteja submetido ao estresse oxidativo. Um tratamento antioxidante, mesmo em concentrações reduzidas pode também ser deletério. Por outro lado, para amostras que apresentem estresse oxidativo, isto é, um desbalanço entre uma maior produção de ROS e uma menor atividade antioxidante, quantidades insuficientes de antioxidante em uma suplementação não apresentariam os efeitos desejados. Assim, o tratamento com diferentes concentrações de antioxidantes torna-se necessário, com o objetivo de identificar a concentração ideal. A ausência de efeitos significativos do tratamento antioxidante, para algumas variáveis avaliadas no presente experimento, pode ter ocorrido pela suplementação com níveis insuficientes ou excessivos. No entanto, os resultados referentes à avaliação da integridade da membrana plasmática indicam que a concentração de 1 mM de GSH pode estar próxima da ideal, uma vez que esta foi significativamente mais eficiente em relação ao controle e numericamente superior em relação às concentrações maiores. No entanto, mais estudos são necessários utilizando concentrações inferiores a esta para comprovar tal hipótese.

6.2 EFEITO DO TRATAMENTO COM VITAMINA E

Os resultados referentes ao efeito do tratamento antioxidante com GSH estão apresentados nas tabelas 4, 5 e 6.

Tabela 4 - Efeito do tratamento com diferentes concentrações de Vitamina E (1mM, 5mM e 10mM) em sêmen canino refrigerado (1 hora) sobre a motilidade e vigor espermáticos - Osasco - 2009

	Concentração de Vitamina E			
	Controle	1 mM	5 mM	10 mM
Motilidade (%)	75,42 ± 3,45	77,50 ± 3,34	75,42 ± 1,99	75,42 ± 3,16
Vigor (1-5)	2,92 ± 0,16	3,29 ± 0,18	2,83 ± 0,21	3,00 ± 0,20

^{a, b} Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas (LSD, $p < 0,05$)

Tabela 5 - Efeito do tratamento com diferentes concentrações de Vitamina E (1mM, 5mM e 10mM) em sêmen canino criopreservado sobre a motilidade e vigor espermáticos, integridade de acrossomo (Pope), integridade de Membrana Plasmática (vivos) e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) - Osasco - 2009

	Concentração de Vitamina E			
	controle	1 mM	5 mM	10 mM
Motilidade (%)	17,33 ± 5,92	14,67 ± 4,03	21,42 ± 4,98	13,92 ± 4,40
Vigor (1-5)	2,28 ± 0,39	2,71 ± 0,21	2,92 ± 0,25	2,37 ± 0,28
Pope (%)	54,58 ± 7,76	47,21 ± 6,03	39,67 ± 7,64	48,92 ± 6,68
Vivos (%)	6,21 ± 1,16	8,46 ± 1,05	6,83 ± 1,09	5,67 ± 0,86
TBARS (ng/10 ⁶ spz)	893,6 ± 76,7	984,8 ± 98,4	1022,0 ± 190,1	904,6 ± 63,2

^{a, b} Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas (LSD, $p < 0,05$)

Tabela 6 - Efeito do tratamento com diferentes concentrações de Vitamina E (1mM, 5mM e 10mM) em sêmen canino criopreservado sobre a atividade mitocondrial espermática (DAB 1 = atividade total; DAB IV = inativa) - Osasco - 2009

	Concentração de Vitamina E			
	Controle	1 mM	5 mM	10 mM
DAB I (%)	60,14 ± 3,98	61,81 ± 3,62	61,20 ± 4,26	56,27 ± 5,29
DAB II (%)	26,74 ± 3,55	29,47 ± 3,45	29,08 ± 3,98	27,00 ± 3,12
DAB III (%)	8,62 ± 1,05 ^a	5,61 ± 0,79 ^b	6,18 ± 0,71 ^{ab}	7,35 ± 1,38 ^{ab}
DAB IV (%)	4,49 ± 0,98	3,11 ± 0,75	3,53 ± 0,70	2,95 ± 0,47

^{a, b} Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatísticas (LSD, p<0,05)

Assim como no tratamento com GSH, as diferentes concentrações utilizadas de Vitamina E não apresentaram efeito sobre a motilidade e vigor após a refrigeração (Tabela 4) e mesmo após a descongelação (Tabela 5). Da mesma forma, para as variáveis porcentagem de espermatozóides com membrana e acrossomo íntegros e susceptibilidade dos espermatozóides ao estresse oxidativo (TBARS), não houve efeito significativo do tratamento com vitamina E. Em relação à atividade mitocondrial, verificou-se um efeito protetor quando as amostras eram tratadas com 1 mM de Vitamina E, sendo que houve uma menor porcentagem de espermatozóides com lesão severa de mitocôndria nas amostras tratadas com esta concentração quando comparadas às amostras controle (Tabela 6).

A vitamina E atua na membrana plasmática, como um antioxidante lipo-solúvel, prevenindo a reação oxidativa em cadeia (MATÈS, 2000). Pela natureza lipídica, a vitamina E penetra em membranas biológicas, sendo considerada uma linha única de defesa antioxidante visto que não necessita estar associada a nenhuma outra substância para terminar com a reação de oxidação em cadeia (CHOW, 1989, FARISS,

1991). Seu principal mecanismo de ação é através da destruição do radical hidroxila (BJÖRNEBOE; DREVON, 1990). Estudos sugerem que a vitamina E esteja presente em todas as membranas celulares, incluindo as membranas de organelas como a mitocôndria, onde está presente na membrana mitocondrial interna, ligada a complexos protéicos (ERNSTER; FOSMARK; NORDENBRAND, 1992). O papel protetor da Vitamina E sobre a mitocôndria pode ser comprovada no presente estudo, já que as amostras tratadas com 5 mM de Vitamina E apresentaram uma menor porcentagem de espermatozóides com lesões severas de mitocôndria. No entanto, seguindo a mesma linha de raciocínio, esperava-se um efeito protetor também em relação à integridade de membrana plasmática e acrossomal, o que não ocorreu. Portanto, da mesma forma que o tratamento com GSH, as diferentes concentrações utilizadas podem não ter sido ideais em evitar os danos causados durante a criopreservação. Apenas para a proteção da atividade mitocondrial, aparentemente a concentração de 1 mM parece estar próxima do ideal, visto que a mesma foi significativamente melhor quando comparada ao controle.

Outro aspecto a considerar, em uma terapia antioxidante, é o tipo de antioxidante a ser empregado. A formação e destruição das ROS é uma reação em cadeia em que cada um dos antioxidantes, em seqüência, elimina as ROS formadas (Figura 1). Assim, caso o antioxidante utilizado no tratamento não seja o responsável pela destruição da ROS mais deletéria em um determinado momento, este tratamento não apresentará os efeitos desejados. A escolha do antioxidante utilizado também é importante em relação ao seu local de ação. Antioxidantes diferentes apresentam atuação mais destacada em determinados compartimentos específicos da célula. Assim, caso os danos causados pelo estresse oxidativo não envolvam este determinado compartimento, o tratamento antioxidante não será eficaz.

6.3 CORRELAÇÕES

Nas Tabelas 7 e 8, estão descritos os resultados encontrados dos coeficientes de correlação entre as variáveis resposta das amostras tratadas com GSH e Vitamina E, respectivamente.:

Tabela 7 – Coeficientes de correlação (significância) entre as variáveis resposta concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), espermatozóides classes I, II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial (DAB I, II, III e IV), espermatozóides com membrana plasmática íntegra (Vivos), espermatozóides com acrossomo íntegro (POPE), Motilidade (MOT) e Vigor (VIG) de amostras espermáticas de cães, coletadas através de manipulação digital e criopreservadas com diferentes concentrações de GSH (0; 1, 5 e 10mM) – Osasco – 2009

	DAB I	DAB II	DAB III	DAB IV	Vivos	POPE	MOT	VIG
TBARS (ng/ml)	0,22 (0,23)	-0,10 (0,57)	-0,23 (0,20)	-0,29 (0,11)	-0,42 (0,01)	0,60 (0,0002)	0,21 (0,31)	0,25 (0,22)
DAB I (%)	1,0	-0,90 ($<0,0001$)	-0,57 (0,0007)	-0,08 (0,65)	-0,02 (0,91)	0,26 (0,14)	0,30 (0,18)	0,23 (0,31)
DAB II (%)	.	1,0	0,19 (0,28)	-0,14 (0,43)	-0,10 (0,56)	-0,21 (0,24)	-0,24 (0,28)	-0,22 (0,32)
DAB III (%)	.	.	1,0	0,10 (0,57)	0,26 (0,15)	-0,24 (0,18)	-0,22 (0,31)	-0,20 (0,37)
DAB IV (%)	.	.	.	1,0	0,08 (0,65)	-0,02 (0,91)	-0,03 (0,88)	-0,02 (0,091)
Vivos (%)	1,0	-0,43 (0,0089)	-0,1 (0,63)	-0,16 (0,44)
POPE (%)	1,0	0,25 (0,22)	0,30 (0,13)
MOT (%)	1,0	0,51 (0,0078)
VIG (0-5)	1,0

Podemos verificar que, nas amostras tratadas com GSH, a susceptibilidade dos espermatozóides ao estresse oxidativo (TBARS) correlacionou-se negativamente com a porcentagem de células com membrana íntegra (Vivos; $r=-0,42$, $p=0,01$) e positivamente com a porcentagem de células com acrossomo íntegro (Pope; $r=0,60$, $p=0,0002$; Tabela 7). Assim, quanto mais susceptíveis os espermatozóides ao estresse

oxidativo, menos a porcentagem de células com membrana íntegra e maior a porcentagem de células com acrossomo íntegro. Observou-se também uma correlação negativa entre a porcentagem de células com acrossomo íntegro e a porcentagem de células com membrana íntegra ($r=-0,43$, $p=0,0089$; Tabela 7). A criopreservação do sêmen (i.e., diluição, refrigeração, congelação e descongelação) altera a membrana plasmática do espermatozóide (PARKS; GRAHAM, 1992). O processo de congelamento e descongelamento altera a permeabilidade seletiva (PHELPS et al., 1999), prejudica a produção de energia (EVENSON; DARZYNKIEWICZ; MELAMED, 1982) reduz a motilidade espermática (DE LEEUW; CALENBRANDER; VERKLEIJ, 1991). A desestabilização da membrana pode estar relacionada a composição da dupla camada lipídica, afetando a fluidez e tornando mais permeável. Isto poderia levar à entrada de cálcio livre, o que poderia levar à mudanças semelhantes às encontradas durante a capacitação (WATSON, 1996). Em espermatozóides bovinos, a criocapacitação pode ser induzida de forma não controlada, independente do pH interno, e mediada por mecanismos diferentes em relação a capacitação *in vitro* por heparina (CORMIER; BAILEY, 2003). Estudos anteriores indicam que, em cachalôs, espermatozóides criopreservados sofrem alterações similares às observadas durante a capacitação (WATSON, 1995; MAXWELL; JOHNSON, 1997; BAILEY; BILODEAU; CORMIER, 2000). Dependendo das técnicas utilizadas para avaliar a capacitação espermática, estas alterações podem ou não ser detectadas. Em estudos anteriores com cachalôs, verificou-se que não houve aumento na criocapacitação em amostras congeladas e descongeladas utilizando-se o ensaio com Merocianina-540 (GREEN; WATSON, 2001; PEÑA et al., 2004). No entanto, alterações nos padrões de clortetraciclina e nos níveis intracelulares de Cálcio livre foram similares aos observados na capacitação verdadeira (GREEN; WATSON, 2001).

Em estudo de Petrunkina et al. (2005b), verificou-se que a refrigeração de sêmen suíno utilizando temperaturas moderadas (até 10 °C) acelerou a capacitação em termos da resposta ao cálcio ionóforo. Espermatozóides criopreservados que sofrem as mudanças semelhantes às encontradas na capacitação podem apresentar reação acrossômica espontânea prematura, perdendo assim sua capacidade de fertilização (BAILEY; BILODEAU; CORMIER, 2000). Nestas células desestabilizadas, quando as

modificações de membrana plasmática e o aumento nos níveis de cálcio intracelular ocorrem demasiadamente rápido, a capacitação espermática ocorre e as membranas se degeneram antes da fusão com o oócito (PETRUNKINA et al., 2005a). Assim, a meia vida do espermatozóide congelado e descongelado no trato reprodutivo feminino é mais curta que em sêmen fresco.

As correlações encontradas no presente experimento podem indicar que as amostras podem ter sofrido a criocapacitação. Além disto, visto que a susceptibilidade ao estresse oxidativo correlacionou-se positivamente com a porcentagem de células com membrana íntegra, pode-se inferir que isto foi causado pelas ROS formadas neste processo, que causaria a desestabilização da membrana plasmática. Isto, no entanto, não foi acompanhada da reação acrossômica. Possivelmente, o tratamento com GSH evitou que as células, após a desestabilização da membrana sofressem a reação acrossômica. Assim, pode-se inferir que um dos gatilhos para a reação acrossômica seria o peróxido de hidrogênio. No entanto, mais estudos são necessário para confirmar esta hipótese. Além disto, é importante ressaltar que a susceptibilidade dos espermatozóides ao estresse oxidativo é uma técnica de desafio, isto é, as células são submetidas a níveis excessivos de ROS, não sendo uma característica fisiológica da célula. Assim, os resultados de TBARS devem ser avaliados com cautela.

Tabela 8 – Coeficientes de correlação (significância) entre as variáveis resposta concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), espermatozóides classes I, II, III e IV na avaliação da atividade mitocondrial (DAB I, II, III e IV), espermatozóides com membrana plasmática íntegra (Vivos), espermatozóides com acrossomo íntegro (POPE), Motilidade (MOT) e Vigor (VIG) de amostras espermáticas de cães, coletadas através de manipulação digital e criopreservadas com diferentes concentrações de Vitamina E (0; 1, 5 e 10mM) – Osasco – 2009

	DAB I	DAB II	DAB III	DAB IV	Vivos	POPE	MOT	VIG
TBARS (ng/ml)	-0,14 (0,46)	0,39 (0,03)	-0,09 (0,66)	-0,28 (0,15)	-0,03 (0,86)	0,42 (0,0093)	0,05 (0,77)	0,25 (0,14)
DAB I (%)	1,0	-0,75 (<0,0001)	-0,35 (0,07)	-0,29 (0,13)	0,03 (0,86)	-0,24 (0,20)	-0,20 (0,30)	-0,18 (0,33)
DAB II (%)	.	1,0	0,12 (0,54)	0,20 (0,31)	-0,01 (0,95)	0,45 (0,01)	0,27 (0,14)	0,43 (0,02)
DAB III (%)	.	.	1,0	0,03 (0,88)	0,28 (0,14)	0,14 (0,47)	0,12 (0,55)	0,006 (0,97)
DAB IV (%)	.	.	.	1,0	0,15 (0,43)	-0,06 (0,77)	0,1 (0,63)	0,12 (0,53)
Vivos (%)	1,0	0,14 (0,40)	0,12 (0,49)	0,02 (0,92)
POPE (%)	1,0	0,21 (0,21)	0,28 (0,09)
MOT (%)	1,0	0,80 (<0,0001)
VIG (0-5)	1,0

Nas amostras tratadas com Vitamina E, verificou-se que a susceptibilidade ao estresse oxidativo correlacionou-se positivamente com a porcentagem de células DAB II (i.e., espermatozóides com mitocôndrias com atividade moderadamente comprometida; $r=0,39$, $p=0,03$) e com a porcentagem de células com acrossomo íntegro (Pope; $r=0,42$, $p=0,0093$; Tabela 8). Verificou-se também que a porcentagem de espermatozóides DAB II correlacionou-se positivamente com a porcentagem de células com acrossomo íntegro ($r=0,45$, $p=0,01$) e com o vigor ($r=0,43$, $p=0,02$). Nas amostras tratadas com vitamina E, não observou-se a correlação encontrada nas amostras tratadas com GSH entre a integridade de membrana e acrossomo. Isto pode ter ocorrido devido a uma proteção antioxidante promovida pela vitamina E, sem que, no entanto, fossem observados efeitos significantes com esta suplementação. Da mesma forma, a correlação positiva entre a susceptibilidade ao estresse oxidativo e a porcentagem de

células com acrossomo íntegro pode ter ocorrido também por um efeito de proteção da vitamina E. Por sua vez, a correlação entre a porcentagem de células DAB II e a susceptibilidade das células ao estresse oxidativo pode indicar que as ROS formadas seriam provenientes de células com alta atividade de membrana que sofreram lesões leves. Resultados semelhantes foram encontrados por Barros (2008), em sêmen de gato-do-mato-pequeno. Neste estudo, verificou-se uma correlação positiva entre a susceptibilidade dos espermatozoides ao estresse oxidativo e a porcentagem de células DAB II. Segundo estes autores, a maior susceptibilidade dos espermatozoides ao estresse oxidativo, tornaria as mitocôndrias a uma maior susceptibilidade a lesões, que, por sua vez, levaria à liberação de fatores pro-oxidativos, levando a danos ainda mais severos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Resultados controversos têm sido obtidos com tratamento de amostras espermáticas com antioxidantes. O tratamento depende de uma série de fatores:

- A exposição do espermatozóide a um estresse oxidativo suficiente para sobrepujar seus mecanismos de defesa, como do aumento dos níveis de antioxidante nos tratos reprodutivos e no espermatozóide em si, que a suplementação possa causar (TAYLOR, 2001);
- Algumas variáveis: qual radical livre, qual momento, qual localização o estresse oxidativo causaria os efeitos deletérios;
- A que compartimento (intra ou extracelular) ou a qual região (acrossomo, membrana plasmática, peça intermediária/mitocôndria, DNA) este antioxidante irá atuar;
- A concentração de antioxidante utilizada, visto que concentrações baixas não apresentarão efeitos benéficos e concentrações altas poderão bloquear alguns eventos fisiológicos importantes;

Os resultados contraditórios encontrados no presente experimento, assim como em estudos anteriores, podem ter ocorrido em decorrência fatores supracitados.

No presente experimento, tanto a vitamina E como o GSH não apresentaram os efeitos benéficos desejados. Provavelmente, a utilização de apenas um antioxidante isoladamente não seja suficiente para proteger todos os compartimentos e regiões de um espermatozóide. Assim, a suplementação com dois ou mais antioxidantes apresente efeitos mais pronunciados. No entanto, esta suplementação não deve ser aleatória. Deve-se levar em conta que a produção e eliminação das ROS ocorrem numa reação em cadeia composta de diversas fases, sendo que, em geral, cada antioxidante atua especificamente em cada uma das fases. Por conseguinte, para que o tratamento seja eficaz, é necessário que se saiba em qual etapa desta cadeia está ocorrendo o estresse oxidativo para que se utilize o antioxidante correto. Como exemplo, podemos citar o superóxido dismutase, que é uma enzima antioxidante que catalisa a dismutase do O_2^- para H_2O_2 . Este, por sua vez, será eliminado pela GPx ou pela catalase. Caso

seja utilizado um tratamento com SOD em amostras ricas em O_2^- , porém com baixos níveis de catalase e GPx, haverá a formação de um excesso de H_2O_2 que é um dos ROS mais deletérios, por sua alta capacidade de penetração em membranas biológicas. Da mesma forma, o tratamento com vitamina C pode apresentar efeitos deletérios, visto que a mesma pode catalisar a transformação de Fe^{2+} para Fe^{3+} . Este, por sua vez, participaria na produção de OH^- a partir do $H_2O_2^-$ (AITKEN et al., 1993c; ENGEL et al., 1999). Assim, na presença de ferro, a vitamina C pode ser extremamente deletéria. Por outro lado, sabe-se que existe uma interação entre as vitaminas E e C. Sabe-se que a vitamina E é regenerada do radical tocoferil (radical formado após a destruição do radical hidroxila pela vitamina E) pela doação de um átomo de hidrogênio pela vitamina C (MUKAI et al., 1991; PACKER et al., 1979). Assim, forma-se uma reação em cadeia em que mais vitamina E é formada.

Assim, mais estudos são necessários utilizando diferentes combinações de antioxidantes para tentar evitar os efeitos deletérios da criopreservação do sêmen em cães.

CONCLUSÃO

8 CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos podemos concluir que o tratamento antioxidante com GSH ou Vitamina E em amostras espermáticas de cães submetidas à criopreservação, não apresentou os efeitos benéficos desejados. Apenas para a atividade mitocondrial os antioxidantes conseguiram um efeito protetor significativo.

REFERÊNCIAS

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.

AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S.; ALLAMANENI, S. What an andrologist/urologist should know about free radicals and why. **Urology**, v. 67, p. 2-8, 2006.

AHMADI, A.; NG, S. C. Developmental capacity of damaged spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 4, n. 9, p. 2279-2285, 1999.

ALLEN, W. E. Avaliação do sêmen. In: _____. **Fertilidade e obstetrícia no cão**. São Paulo: Varela, 1995. p. 43-55.

AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparations techniques. **Journal of Andrology**, v. 9, p. 367-376, 1988.

AITKEN, R. J.; IRVINE, D.S.; WU, F. C. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 164, p. 542-551, 1991.

AITKEN, R. J. ; BUCKINGHAM, D. W.; WEST, K.; WU, F. C. ZIKOPOULOS, K; RICHARDSON, D. W. Differential contribution of leukocytes and spermatozoa to the generation of reactive oxygen species in the ejaculates of oligozoospermic patients and fertile donors. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 94, p. 451-462, 1992.

AITKEN, R. J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. W. Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, p. 257-265, 1993a.

AITKEN, R. J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. W. Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, p. 257-265, 1993b.

AITKEN, R. J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 659-668, 1995.

AITKEN, R. J.; BARKER, M. A. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma. **International Journal of Andrology**, v. 25, p. 191-194, 2002.

AITKEN, R. J.; DE LULIIS, G. N. MCLACHALAN, R. I. Biological and clinical significance of DNA damage in the male germ line. **International Journal of Andrology**, v. 32, p. 46-56, 2008.

ALMEIDA, J.; BALL, B. A., Effect of alfa-tocoferol e tocoferol succinato na peroxidação do espermatozóide de eqüinos. **Animal Reproduction Science**, v. 87, p. 321-337, 2005.

ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against lost of motility. **Biology of Reproduction**, v. 29, p. 548-555, 1983.

ALVAREZ, J. G.; TOUCHSTONE, J. C.; BLASCO, L.; STOREY, B. T. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. **Journal of Andrology**, v. 8, p. 338-348, 1987.

ANDERSON, M. E. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. **Chemico-Biological Interactions**, v. 1, n. 14, p. 111-112, 1998.

ARMSTRONG, J. S.; RAJASEKARAN, M.; CHAMULITRAT, W.; GATTI, P. ; HELLSTROM, W. J.; SIKKS, S. C. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 7/8, p. 869-880, 1999.

BAILAY, J. L.; BILODEAU, J.F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 1, January/February 2000.

BAKER, M. A; AITKEN, R. J. Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. **Reproduction of Biology Endocrinology**, v. 3, p. 67, 2005.

BAPTISTA SOBRINHO, C. A. **Efeitos do estresse de trabalho sobre os parâmetros seminais de cães da raça rottweiler**. 2002. 73 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

BARROS, P. M. H. **Estresse oxidativo e integridade do DNA em semen resfriado de gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*, SCHREBER, 1775)**. 2007. 130 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007

BARTLETT, D. J. Studies on dog sêmen. I. Morphological characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 3, p. 173-189, 1962.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: Iowa State University Press, 1989. 285 p.

BECONI, M. T.; FRANCIÀ, C. R.; MORA, N. G.; AFFRANCHIO, M. A. effect of natural antioxidant on frozen bovine semen preservation. **Theriogenology**, v. 40, p. 841-851, 1993.

BILODEAU, J. F.; BLANCHETTE, S.; GAGNON, C.; SIRARD, M. A. Thiols prevent H₂O₂ – mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, v. 56, p. 275-288, 2001.

BJÖRNEBOE, A.; BJÖRNEBOE, G. E. A.; DREVON, C. A. Absorption, Transport and Distribution of Vitamin E, **The Journal of Nutrition**, v. 120, p. 233-242, 1990.

BOUCHARD, G. F., MORRIS, J. K., SIKES, J. D., YOUNGQUIST, R. S. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoa motility, **Theriogenology**, v. 34, p. 147-157, 1990.

CALAMERA, J. C.; FERNANDEZ, P. J.; BUFFONE, M. G.; ACOSTA, A. A.; DONCEL, G. F. Effect of long-term in vitro incubation of human spermatozoa: functional parameters and catalase effect. **Andrologia**, v. 33, n. 2, p. 79-86, 2001.

CARDOSO, R. C. S.; SILVA, A. R.; SILVA, L. D. M. Métodos de avaliação do sêmen canino congelado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 29, n. 3/4, p. 179-187, jul./dez. 2005.

CARVALHO, S. F. M.; PEREIRA, M. T. C.; LIMA, T. B. F. Congelamento de sêmen e inseminação artificial em cães. Revisão. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, n. 7, v. 1, p. 49-52, 2004.

CASSANI, P.; BECONI, M. T.; O'FLAHERTY, C. Relationship between total superoxide dismutase activity with lipid peroxidation, dynamics and morphological parameters in canine semen. **Animal Reproduction Science**, v. 86, p. 163-173, 2005.

CHAUDIERE, J.; WILHELMSSEN, E. C.; TAPPEL, A. L. Mechanism of selenium-glutathione peroxidase and its inhibition by mercaptocarboxylic acid and other mercaptans. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 259, p. 1043-1050, 1984.

CHOW, C. K. Vitamin E in plasma, erythrocytes and erythrocyte membranes. **Progress in clinical and biological research**, v. 292, p. 445-51, 1989.

CHRISTIANSEN, I. J. Reprodução no cão e no gato. São Paulo: Manole, 1988.

CONCANNON, P. W., BATTISTA, M. Canine semen freezing and artificial insemination. In: KIRK, R. W. (Ed). **Current veterinary therapy**. Philadelphia: WB Saunders, 1989, p. 1247-1259.

CORMIER, N.; BAILEY, J. L. A differential mechanism is involved during heparin- and cryopreservation-induced capacitation of bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 177-185, 2003.

CUNHA, I. C. N. **Estudo da viabilidade do processo de refrigeração do sêmen canino utilizando-se diluidores à base de leite e glicina-gema.** 1997. 124 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1997.

CUNHA, I. C. N.; LOPES, M. D. Efeitos da Centrifugação sobre a qualidade do sêmen canino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 3, p. 306-308. Jul./Set. 1999.

CUNHA, I.C.N. **Criopreservação do sêmen de cães.** 2002, 149 p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate (ATP) plays an important role in inhibition of sperm motility. **Journal of Andrology**, v. 13, p. 379-386, 1992.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 14, p. 255-265, 1993.

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

DE LEEUW, F. E.; CALENBRANDER, B.; VERKLEIJ, A. J. The role membrane damage plays in cold shock and freezing injury. In: JOHNSON, L. A.; RATH, D. (Ed.) **Boar semen preservation**. Berlin: Paul Parey Scientific Publishers, 1991, p. 95-104.

DONNELLY, E. T.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. E. M. Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. **Fertility and Sterility**, v. 72, n. 3, p. 484-495, 1999.

ELLEGREN, H. The dog has its day. **Nature**, v. 38, n. 8, p. 745, 2005.

ERNSTER, L.; FOSMARK, P.; NORDENBRAND, K. The mode of action of lipid-soluble antioxidants in biological membranes. Relationship between the effects of ubiquinol and vitamin E as inhibitors of lipid peroxidation in submitochondrial particles, **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, p. 548-551, 1992 Spec. No.

ENGEL, S.; SCHREINER, T.; PETZOLDT, R. Lipid peroxidation in human spermatozoa and maintenance of progressive sperm motility. **Andrologia**, v. 31, n. 1, p. 241-244, 1993.

ENGLAND, G. C. W. Cryopreservation of dog semen: a review. **Journal of Reproduction and Fertility**, s. 47, p. 243 -255, 1993.

ENGLAND, G. C. W.; PONZIO, P. Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled rewarmed dog semen. **Theriogenology**, v. 46, p. 165-171, 1996.

EVENSON, D. P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M. R. Simultaneous measurements by flow cytometry of sperm cell viability and mitochondrial membrane potential related to cell motility, **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 30, p. 279-280, 1982.

FARISS, M. W. Cadmium toxicity: Unique cytoprotective properties of alpha tocopheryl succinate in hepatocytes, **Toxicology**, v. 69, p. 63-77, 1991.

FELDMAN, E. D.; NELSON, R. C. Clinical and diagnostic evaluation of the male reproductive tract. In: _____. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996. p. 673-690.

FOOTE, R. H. Extenders for freezing dog semen. **American Journal of Veterinary Research**, v. 25, p. 37-40. 1964.

FRAGA, G. G.; MOTCHNIK, P. A.; SHIGENAGA, M. K.; HELBROCK, J. H.; JACOB, R. A.; AMES, B. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 88, p. 11003-11006, 1991.

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, n. 1, p. 1-16, 1997).

FORD, W. C. L. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. **Human Reproduction Update**, v. 10, n. 5, p. 387-399, 2004.

FUJII, J.; IUCHI, Y.; MATSUKI, S.; ISHII, T. Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues. **Asian Journal of Andrology**, v. 5, p. 231-242, 2003.

GABALDI, S. H.; LOPES, M.D. Considerações sobre a congelação de sêmen canino. **Clínica Veterinária**, Ano III, n. 14, p. 24-26, maio/jun., 1998.

GADEA, J; GUMBAO, D.; CÁNOVAS, S.; GARCIA-VAZQUEZ, 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.

GARRIDO, N.; MESEGUER, M.; SIMON, C.; PELLICER, A.; REMOHI, J. Pro-oxidative ant anti-oxidant imbalance in human sêmen ant its relation with male fertility. **Asian Journal of Andrology**, v. 6, p. 59-65, 2004.

GÓES, P. A. A. **Dosagem dos níveis de antioxidantes enzimáticos e resistência celular ao estresse oxidativo, do sêmen de perdizes (*Rhychotus rufescens*) criadas em cativeiro e suplementadas com selênio.** 2008. 114 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

GRANDJEAN, D; VAISSAIRE, J.J. **Enciclopédia do cão Royal Canin.** 1ª ed. Paris: Ed. Aniwa, 2001. 635 p.

GREEN, C. E.; WATSON, P. F. Comparison of the capacitation-like state of cooled boar spermatozoa with true capacitation. **Reproduction**, v. 122, p. 889-898, 2001.

GRIVEAU, J. F.; LE LANNOU, D. Effects of antioxidants on human sperm preparation techniques. **International Journal of Andrology**, v. 17, p. 225-231, 1994.

GRIVEAU, J. F.; DUMONT, E.; RENARD, P.; CALLEGARI, J. P.; LE LANNOU, D. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defense systems in human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 103, n. 1, p. 17-26, 1995.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reproduction in farm animals.** 7th ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins, 2004. 592 p.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in Biology and Medicine.** Oxford: Claredon Press, 1989. 543 p.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. **American Journal of Medicine**, v. 91, p. 14-22, 1991.

HATAMOTO, L. K.; BAPTISTA SOBRINHO, C. A. ; NICHI, M.; BARNABE, V. H.; BARNABE, R. C.; CORTADA, C. N. M. Effects of dexamethasone treatment (to mimic stress) and vitamine E oral supplementation on the spermiogram and on seminal plasma spontaneous lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in dogs. **Theriogenology**, v. 66, p. 1610-1614, 2006.

HERBERT, V. The antioxidant supplement myth. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 60, p. 157-158, 1994.

HOWARD, J. G. Semen collection and analysis in carnivores. In: FOWLER, M. E. **Zoo and wild animal medicine current therapy**. 3. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1993. p. 390-399.

HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. **International Journal of Andrology**, v. 19, n. 6, p. 809-828, 1987.

IMAI, H.; NARASHIMA, K.; ARAI, M.; SAKAMOTO, H.; CHIBA, N.; NAKAGAWA, Y. Suppression of leucotriene formation in RBL-2H3 cells that overexpressed phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 1990-1997, 1998.

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

JEULIN, C.; SOUFIR, J.C.; WEBER, P. ; LAVAL-MARTIN, D.; CALVAYRAC, R. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. **Gamete Research**, v. 24, p. 185-196, 1989.

JONES, R.; MANN, T. Damage to spermatozoa by peroxidation endogenous phospholipids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 50, p. 261-68, 1977.

JOHNSTON, S. D. Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 21, n. 9, p. 545-551, May 1991.

KODAMA, H.; KURIBAYASHI, Y.; GAGNON, C. Effects of sperm lipid peroxidation on fertilization. **Journal of Andrology**, v. 16, p. 151-157, 1996.

LENZI, A.; PICARDO, M.; GANDINI, L.; LOMBARDO, F.; TERMINALI, O.; PASSI, S.; DONDERO, F. Glutathione treatment of dyspermia: effect on the lipoperoxidation process. **Human Reproduction**, v. 9; p. 2044-2050, 1994.

LENZI, A.; GANDINI, L.; PICARDO, M.; TRAMER, F.; SANDRI, G.; PANFILI, E. Lipoperoxidation damage of spermatozoa polyunsaturated fatty acids (PUFA): Scavenger mechanisms and possible scavenger therapies. **Frontiers in Bioscience**, v. 5, p. 1-15, 2000.

LINDE-FORSBERG, C., FORSBERG, M. Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, s. 39, p. 299-310. 1989.

MAIA, M. S. **Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de lauril sulfato de sódio (OEP), trolox-C e catalase**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade do Estado de São Paulo, Botucatu. 2006.

MARCHETTI, F.; WYROBEK, A. J. **Mechanisms and consequences of paternally-transmitted chromosomal abnormalities**. Birth Defects Research (Part C). Embryo Today, v. 75, p. 112-129, 2005. Disponível em <<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/110572827/PDFSTART>>. Acesso em: 1º set. 2009.

MARTINDALE, J. L.; HOLBROOK, N. J. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival, **Journal of Cellular Physiology**, v. 192 , p. 1-15, 2002.

MARTINS-BESSA, A.; ROCHA, A.;MAYENCO-AGUIRRE, A. Incorporation of taurine and hypotaurine did not improve the efficiency of the Uppsala Equex II extender for dog semen freezing. **Theriogenology**, v. 68, p. 1088-1096, 2007.

MATÈS, J. M. Effect of antioxidant enzymes in molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v. 153, p. 83-104, 2000.

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

MAZZILLI, F.; ROSSI, T.; SABATINI, L.; PULCINELLI, F. M.; RAPONE, S.; DONDERO, F.; GAZZANIGA, P. P. Human sperm cryopreservation and reactive oxygen species (ROS) production. **Acta of European Fertility**, v. 26, n. 4, p. 145-8, Jul./Aug. 1995.

MIALOT, J. P. **Patologia da reprodução dos carnívoros domésticos**. Porto Alegre: A Hora Veterinária, 1988. p. 61-67.

- MICHAEL, A. J.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E. A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. J.; SARATSIS, Ph.; VERVERIDIS, H.N.; BOSCOS, C.M. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 68, p. 204-212, 2007.
- MICHAEL, A. J.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E. A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. J.; SARATSIS, Ph.; VERVERIDIS, H. N.; BOSCOS, C. M. Quality and reactive oxygen species of extended canine semen after vitamin C supplementation. **Theriogenology**, v. 70, p. 827-835, 2008.
- MICHAEL, A. J.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E. A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. J.; SARATSIS, Ph.; VERVERIDIS, H. N.; BOSCOS, C. M. Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 112, p. 119-135, 2009.
- MONTEIRO, J.C.; GONÇALVES, J.S.A.; RODRIGUES, J.A.; LÚCIO, C.F.; SILVA, L.C.G.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.A.; VANNUCCHI, C.I. Influence of ascorbic acid and glutathione antioxidants on frozen-thawed canine semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 359-362, 2009 Supplement 2.
- MUKAI, K.; NISHIMURA, M.; KIKUCHI, S. Stopped-flow investigation of the reaction of vitamin C with tocopheroxyl radical in aqueous Triton X-100 micellar solutions. The structure-activity relationship of the regeneration reaction of tocopherol by vitamin C. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 274-278, 1991.
- NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 2003. 137 p.
- NICHI, M. **Sistemas de proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídeos seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de Dourados, MS**. 2003, 101 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- NORDEBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical in Biology & Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.
- OETTLÉ, E.E. Sperm morphology and fertility in the dog. **Journal of Reproduction and Fertility**, s. 47, p.257-260, 1993.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.

OLSON, P. N. Using canine genome to cure cancer and others diseases. **Theriogenology**, v. 68, p. 378-381, 2007.

PACKER, J. E.; SLATER, T. F.; WILLSON, R. L. Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. **Nature**, n. 278, p. 737-738, 1979.

PARKS, J. E, HAMMERSTEDT, R. H. Development changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. **Biology of Reproduction**, v. 32, p. 653-668, 1985.

PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes, **Theriogenology**, v. 38, p. 209-222, 1992.

PEÑA, F. J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Antioxidant supplementation of boar spermatozoa from different fractions of the ejaculate improves cryopreservation changes in sperm membrane lipid architecture. **Zygote**, v. 12, p. 117-124, 2004.

PEÑA, J.; NÚÑEZ-MARTINEZ, I, MORAN, J. M. Semen technologies in dog breeding: an update. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p. 21–29, 2006 Supplement 2.

PEÑA-MARTINEZ, I. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 209-224, 2004.

PETRUNKINA, A. M.; VOLKER, G.; WEITZE, K. F.; BEYERBACH, M.; TÖPFER-PETERSEN, E. WABERSKI, D. Detection of cooling-induced membrane changes in the response of boar sperm to capacitating conditions. **Theriogenology**, v. 63, p. 2278-2299, 2005a.

PETRUNKINA, A. M.; VOLKER, G.; BRANDT, H.; TÖPFER-PETERSEN, E.; WABERSKI, D. Functional significance of responsiveness to capacitating conditions in boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 64, p. 1766-1782, 2005b.

PHELPS, M. J.; LIU, J.; BENSON, J. D.; WILLOUGHBY, C. E.; GILMOR, J. A.; CRISTER, J. K. Effects of Percoll separation, cryoprotective agents, and temperature on plasma membrane permeability characteristics of murine spermatozoa and their relevance to cryopreservation, **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 1031-1041, 1999.

PLATZ, C.C., SEAGER, S.W.J. Successful pregnancies with concentrated frozen canine semen. **Laboratory Animals Science**, v.27, p. 1013-1016, 1977.

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

SANTOS, S. E. C. **Comparação entre cinco diluidores na congelação de sêmen de cães**. 1997. 65 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1997.

SANTOS, S. E. C.; VANNUCCHI, C. I. Inseminação artificial em cães. **Clínica Veterinária**, v. 2, n. 6, p. 22-24, 1997.

STATISTICAL ANALYZE SYSTEMS. **SAS user's guide: satatistics**. Versão 9.1.3 English. Cary: SAS. 2005.

SEAGER, S.W.J., FLETCHER, W.S. Collection, storage and insemination of canine semen. **Laboratory Animals Science**, v. 22, p.177-182, 1972.

SEAGER, S. W. J.; PLATZ, C. C. Collection and evaluation of canine semen. **Veterinary Clinics of North America**, v. 7, p. 757-764, Nov. 1977.

SEIFRIED, H. E.; ANDERSON, D. E.; FISHER, E.; MILNER, J. A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 18, p. 567-579, 2007.

SENGOKU, K.; TAMATE, K.; YOSHIDA, T.; TAKAOKA, Y.; MIYAMOTO, T.; ISHIKAWA, M. Effects of low concentrations of nitric oxide on the zona pellucida binding ability of human spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 69, n. 3, p. 522-527, 1998.

SHARMA, R. K.; AGARWAL, A. A role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, v. 48, n. 6, p. 835-850, 1996.

SILVA, L. D. M.; SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S. Inseminação artificial em cães. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 1. Ed. São Paulo: Varela, 2002. p. 69-95.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; UCHOA, D.C., SILVA, L.D.M. Effect of Tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing. **The Veterinary Journal**, v. 164, p. 244-246, 2002.

SILVA, A.R.; CARDOSO, R.C.S.; UCHOA, D.C., SILVA, L.D.M. Quality of canine semen submitted to single or fractionated glycerol addition during the freezing process. **Theriogenology**, v. 59, p. 821-829, 2003.

SILVA, A. R. **Criopreservação do sêmen canino diluído em Tris: Avaliação morfológica, funcional e de suas interações com oócitos homólogos**. 2005. 165 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) -Faculdade de Veterinária - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2005.

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 sêmen. **Animal Reproduction Science**, v. 41, p. 237-243, 1996.

SOUZA, J. A. T. de **Estudo de algumas características do sêmen de cães da raça pastor alemão**. 1985. 80 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1985.

SOUZA, J. A. T.; SPICCIATI, W; VISINTIN, J. A.; BARNABE, V. H.; BARNABE, R. C. Características seminais de cães da raça Pastor Alemão. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 181-186, 1995.

TAYLOR, C. T. Antioxidants and reactive oxygens species in human fertility. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 10, p. 189-198, 2001.

THIELE, J. J.; FREISLEBEN, H. J.; FUCHS, J.; OSCHENDORF, F. R. Ascorbic acid and urate in human seminal plasma: determination and interrelationship with chemiluminescence in washed semen. **Human Reproduction**, v. 10, p. 110-115, 1995.

- THOMSON, L. K.; FLEMING, S. D.; AITKEN, R. J.; DE IULIIS, G. N.; ZIESCHANG, J. A.; CLARK, A. M. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. **Human Reproduction**, v. 24, n. 9, p. 2061-2070, 2009.
- TWIGG, J.; FULTON, N.; GOMEZ, E.; IRVINE, A. S.; AITKEN, E. J. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. **Human Reproduction**, v. 13, n. 6, p. 1429-1436, 1998.
- VALENÇA, R. M. B.; GUERRA, M. M. P. Espécies reativas de oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 1, p. 47-53, jan./mar. 2007.
- VANNUCCHI, C. I.; SATZINGER, S.; SANTOS, S. E. C. Avaliação seminal em cães- aspectos práticos. **Clínica Veterinária**, São Paulo, v. 3, n. 15, p. 22-7, Jul. 1998.
- VASKE, T. R., MORAES, H. F., ROMÃO, A.R., BLASI, A.C., PERASSI, P., AUN, G.C. Seis cães normais nascidos de sêmen congelado. **A Hora Veterinária**, v. 1, p. 15-18, 1981.
- VERNET, P.; AITKEN, R. J; DREVET, J. R. Antioxidant strategies in the epididymis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 216, p. 31-39, 2004.
- WANG, A. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. **Urology**, v. 49, n. 6, p. 921-925, 1997.
- WANG, A. W.; ZHANG, H.; IKEMOTO, I; ANDERSON, D. J; LOUGHLIN, K. R. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. **Urology**.; v. 49, n. 6, p. 921-925, Jun. 1997.
- WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 871-891, 1995.
- WATSON, P. F. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 31, p. 135-140, 1996.
- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 481-492, 2000.

WU, G.; FANG, Y. Z.; YANG, S.; LUPTON, J. R.; TURNER, N. D. Glutathione metabolism and its implications for health. **The Journal of Nutrition**, v. 134, p. 489-492, 2004.

XIAO, L.; PIMENTEL, D. R.; WANG, J.; KRISHNA SINGH, K.; COLUCCI, W. S.; SAWYER, D. B. Role of reactive oxygen species and NAD(P)H oxidase in α_1 -adrenoceptor signaling in adult rat cardiac myocytes. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 282, n. 4, p. 926-934, April 2002

ZRIBI, N.; CHAKROUN, N. F.; EL EUCH, H.; GARGOURI, J.; BAHLOUL, A.; KESKES, L. A. Effects of cryopreservation on human sperm deoxyribonucleic acid integrity, **Fertility and Sterility**, In Press, Corrected Proof, Available online 21 November 2008, ISSN 0015-0282.

ANEXO

ANEXO

ANEXO 1 – COMPOSIÇÃO DO DILUENTE UTILIZADO

Para cada 100 mL de diluente	
Tris (tris-hidroximetil aminometano)	3,187 g
Ácido cítrico	1,781 g
Frutose	1,316 g
Gema de ovo	20 %
Penicilina	1000 UI/mL
Estreptomicina	1000 µg/mL
Água destilada qsp	100 mL

Fonte: SANTOS (1997).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)