

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA  
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**INFLUÊNCIA DOS DANOS OXIDATIVOS NA QUALIDADE  
ESPERMÁTICA EM BOVINOS DE DIFERENTES IDADES**

**Juliane Teramachi Trevizan**  
Médica Veterinária

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL**  
**2013**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA  
FILHO” FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**INFLUÊNCIA DOS DANOS OXIDATIVOS NA QUALIDADE  
ESPERMÁTICA EM BOVINOS DE DIFERENTES IDADES**

**Juliane Teramachi Trevizan**

**Orientadora:** Profa. Marion Burkhardt de Koivisto

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, câmpus de Jaboticabal, como parte para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária na área de concentração – Reprodução Animal.

**JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL**

**Julho de 2013**

T814i Trevizan, Juliane Teramachi  
Influência dos danos oxidativos na qualidade espermática em bovinos de diferentes idades / Juliane Teramachi Trevizan. – – Jaboticabal, 2013  
ix, 44 p. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013

Orientadora: Marion Burkhardt de Koivisto

Banca examinadora: Janaina Torres Carreira, Maricy Apparicio Ferreira

Bibliografia

1. Idade. 2. Touros. 3. Criopreservação. 4. Sêmen. 5. DNA. 7. Estresse Oxidativo I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.6:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO:** INFLUÊNCIA DOS DANOS OXIDATIVOS NA QUALIDADE ESPERMÁTICA  
EM BOVINOS DE DIFERENTES IDADES

**AUTORA:** JULIANE TERAMACHI TREVIZAN

**ORIENTADORA:** Profa. Dra. MARION BURKHARDT DE KOIVISTO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA  
VETERINÁRIA, Área: REPRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARION BURKHARDT DE KOIVISTO

Departamento de Clínica e Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de  
Araçatuba

Profa. Dra. JANAINA TORRES CARREIRA

Centro Universitário de Rio Preto / São José do Rio Preto/SP

Profa. Dra. MARICY APARECIDO FERREIRA

Faculdade de Jaguariuna / Jaguariuna/SP

Data da realização: 12 de julho de 2013.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**Juliane Teramachi Trevizan** – nascida em Ivinhema-MS, no dia 2 do mês de Dezembro de 1987; concluiu o ensino médio no Colégio Professora Maria Eunides de Melo, na cidade de Ivinhema-MS, em dezembro de 2004. Ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária no Centro Universitário da Grande Dourados – UNIGRAN, na cidade de Dourados – MS, em fevereiro de 2005. Concluiu o curso superior em Medicina Veterinária em dezembro de 2008. Ingressou no programa de Residência de Residência Médico Veterinária, na área de Reprodução Animal, na Faculdade de Medicina Veterinária Campus de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista – UNESP entre fevereiro de 2009 a janeiro de 2011. Ingressou no curso de pós-graduação, nível de Mestrado em março de 2011, sob orientação da Adjunta Marion Burkhardt de Koivisto, no Programa de Medicina Veterinária, Área de Concentração em Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Câmpus de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista – UNESP.

## EPÍGRAFE

*Na vida é necessário ter três grandes requisitos:  
uma coisa para fazer,  
uma coisa para amar  
e uma coisa para esperar.*

**Joseph Addison**

## **DEDICO**

A toda a minha família, principalmente a minha avó Setsuko, ao meu avô Michio e minha Mãe Sonia, amo vocês.

## AGRADECIMENTOS

Á Deus onde encontrei a fé e a esperança que tudo iria dar certo e Nossa Senhora Desatadora dos nós.

Á minha orientadora **Profa. Marion B. Koivisto**, que abriu as portas para esse universo acadêmico, pelo seu conhecimento e paciência. Sempre me encorajando a enfrentar os desafios e acreditar no potencial individual de cada ser.

Á minha **Mãe**, que mesmo pela distancia nunca me deixou pensar que estava sozinha, sempre acreditando na sua pequena e única menina. Você é o meu mundo mãe, com você o céu é azul e a tempestade não existe.

Á minha segunda **Mãe “Dona Cida”**, o seu carinho e sua paciência. Aqueles dias em que você me acordava tão cedo para ir à escola não foram em vão, meus sinceros agradecimentos.

Ao meu avô **“Di”**, figura paterna e símbolo de coragem. Cada passo que dei nessa vida foi porque seus conselhos foram ouvidos e seguidos.

Ás minhas primeiras amigas aqui em Araçatuba-SP, **Simone Bernardo e Janaína Torres Carreira**, duas mulheres fortes e determinadas, vocês foram fundamentais para meu crescimento profissional e meu braço direito pra tudo.

A **Isadora Resende Carvalho “Bichão de Goiás”** foram tantas jantinhas fora de hora, tantas risadas e TPM juntas, que ao lembrar que daqui uns dias novos rumos tomaram em nossas vidas, me faz chorar. Um pouco desse choro é de alegria, por saber que você estará realizada e muito feliz, mas ao mesmo tempo, tem o choro de saudade que vai doer muito. Minha amiga e irmã muito obrigada por Deus ter colocado você perto de mim.

Á **Bruna Helena Kipper “Guria”** pela ajuda nas traduções dos resumos e na execução de parte do experimento. Além disso, pelo seu jeito de ser que renderam



boas risadas, lembranças e que me ajudaram a me manter firme nesse caminho cheio de oscilações.

A Professora e amiga **Maricy Apparício** por todo apoio pessoal e profissional durante minha residência e mestrado.

Aos funcionários da FMVA **Esaú, Claudete, Elza, Silvia, Marta e Clédio** pelos inúmeros telefonemas e ajuda na limpeza dos materiais.

Aos amigos **Maurício, Luiz, Andreia, Joana, Breno, Vanessa, Daniela, Paula e Carol**.

À professora **Silvia Helena Venturoli Perri** pela ajuda na estatística deste experimento.

À **Marcílio Nichi** pela ajuda na padronização do TBARS e pelas inúmeras dúvidas que surgiram.

À **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP – Câmpus de Jaboticabal** pela oportunidade da realização do Mestrado e à **Faculdade de Medicina Vetrinária – UNESP – Câmpus de Araçatuba** pelo acolhimento sempre tão positivo.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) pela concessão da Bolsa de Estudos, durante a etapa inicial do mestrado.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)** pela concessão da bolsa e auxílio do projeto.

Muito obrigada!

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMO.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Métodos utilizados para mensurar o estresse oxidativo.....	7
2.1.1 Mensuração de ROS.....	7
2.1.2 Avaliação da peroxidação lipídica.....	7
2.1.3 Avaliação de danos oxidativos no DNA.....	8
III. HIPÓTESE.....	10
IV. OBJETIVOS.....	10
V. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
5.1 Seleção dos animais.....	11
5.2 Análises físicas e funcionais dos espermatozóides.....	11
5.3 Motilidade e vigor espermático.....	12
5.4 Concentração.....	12
5.5 Morfologia espermática.....	12
5.6 Avaliações da integridade de membranas – PI e FITC/PSA.....	13
5.7 Avaliação do potencial mitocondrial – JC—1.....	13
5.8 Avaliação da geração de ânion superóxido – DHE.....	14
5.9 Ensaio da substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico –	
TBARS.....	15
5.10 Avaliação da peroxidação lipídica – BodipyC <sub>11</sub> <sup>581/591</sup> .....	15

5.11 Avaliação dos danos de DNA causados por ROS – 8OHdG.....	16
VI. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	17
VII. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
7.1 Motilidade e vigor.....	18
7.2 Concentração e morfologia espermática.....	19
7.3 Integridade da membrana plasmática e acrossoma.....	20
7.4 Potencial mitocondrial.....	22
7.5 Geração intracelular de ROS – ânion superóxido.....	24
7.6 Peroxidação lipídica.....	25
5.7 Danos oxidativos no DNA.....	27
5.8 Correlações.....	29
VIII. CONCLUSÃO.....	34

## LISTA DE FIGURAS

		<b>Página</b>
<b>FIGURA 1.</b>	Fotomicrografia de espermatozoides corados pelo <i>kit</i> 8OHdG. A) Espermatozoide sem dano oxidativo na cromatina. B) Espermatozoide com danos oxidativos na cromatina (seta) avaliado pela microscopia de fluorescência (Olympus BX61, 400X).....	<b>28</b>
<b>FIGURA 2.</b>	Representação gráfica da correlação entre danos de DNA avaliado pela formação da 8 -OhdG e baixo potencial mitocondrial utilizando a sonda JC1. Nota – se que houve correlação positiva entre essas duas variáveis (R=0,39; p<0,01).....	<b>32</b>
<b>FIGURA3.</b>	Representação gráfica da correlação entre danos de DNA avaliado pela formação da 8 -OhdG e membrana e acrossoma íntegros utilizando a associação das sondas PI e FITC -PSA.. Nota – se que houve correlação negativa entre essas duas variáveis (R=-0,33; P<0,03).....	<b>33</b>

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>TABELA 1.</b> Distribuição dos animais por grupos experimentais determinados pela idade (anos: jovens, adultos e senis) de touros da raça Nelore, média e desvio padrão das idades e idade mínima e máxima dos animais.....	11
<b>TABELA 2.</b> Média e desvio padrão da motilidade (porcentagem) e do vigor (0 a 5) de touros jovens (n=27), adultos (n=52), senis (n=34) no sêmen pós-descongelção, avaliados em microscopia de contraste de fase.....	18
<b>TABELA 3.</b> Média e desvio padrão da concentração espermática (x10 <sup>6</sup> /palheta), da porcentagem de defeitos maiores, menores e totais dos touros de touros jovens (n=27), adultos (n=52) e senis (n=34), no sêmen pós-descongelção, avaliados em microscopia de interferência diferencial (DIC, imersão em óleo, 1000x).....	19
<b>TABELA 4.</b> Média e desvio padrão da porcentagem de espermatozoides, quanto à integridade da membrana plasmática e acrossoma, corados pela associação das sondas fluorescentes PI e FITC-PSA e avaliados pela citometria de fluxo em touros jovens (n=27), adultos (n=52) e senis (n=34), no sêmen pós descongelção.....	20
<b>TABELA 5.</b> Média e desvio padrão da porcentagem de espermatozoides com membrana lesada (MLAI+MLAL) e acrossoma lesado (MIAL+MLAL), obtidas pela soma dos resultados obtidos pela coloração simultânea com as sondas fluorescentes PI e FITC-PSA e avaliados pela citometria de fluxo em touros jovens (n=27), adultos (n=52) e senis (n=34), no sêmen pós-descongelção.....	21
<b>TABELA 6.</b> Média e desvio padrão das porcentagens de espermatozoides corados com JC-1 e avaliados por citometria de fluxo quanto ao potencial mitocondrial (alto, médio e baixo) dos grupos de touros Jovens (n=27), Adultos (n=52) e Senis (n=34), no sêmen pós-descongelção.....	23
<b>TABELA 7.</b> Média ( $\bar{x}$ ), desvio padrão ( $s$ ) e mediana ( $Med$ ) da porcentagem de espermatozóides viáveis gerando ânion de superóxido por meio da sonda fluorescente DHA avaliados	24

	pela citometria de fluxo em touros Jovens (n=27), Adultos (n=52) e Senis (n=34), no sêmen pós-descongelamento.....	
<b>TABELA 8.</b>	Média ( $\bar{x}$ ), desvio padrão ( $s$ ) e mediana ( $Md$ ) da susceptibilidade da célula espermática à peroxidação lipídica avaliados pela técnica do TBARS (ng x 106 espermatozoides) por espectrofotometria em touros Jovens (n=27), Adultos (n=52) e Senis (n=34), no sêmen pós-descongelamento.....	<b>25</b>
<b>TABELA 9.</b>	Média ( $\bar{x}$ ), desvio padrão ( $s$ ) e mediana ( $Md$ ) o padrão da porcentagem de espermatozoides viáveis apresentando peroxidação lipídica corados com BODIPYC11581/591 e avaliados pela citometria de fluxo em touros Jovens (n=27), Adultos (n=52) e Senis (n=34), no sêmen pós-descongelamento..	<b>26</b>
<b>TABELA 10.</b>	.Média ( $\bar{x}$ ), desvio padrão ( $s$ ) e mediana ( $Md$ ) da porcentagem de espermatozoides com alterações na cromatina causadas por danos oxidativos utilizando kit 8-OHdG e avaliados por citometria de fluxo para os grupos de touros Jovens (n=27), Adultos (n=52) e Senis (n=34), no sêmen pós-descongelamento.....	<b>27</b>
<b>TABELA 11.</b>	Coeficiente de correlação e valor de P das variáveis alto e baixo potencial mitocndrial, MIAI, membrana lesada, acrossoma lesado, ânion superóxido, peroxidação lipídica e danos no DNA em relação à idade no sêmen pós descongelamento.....	<b>29</b>
<b>TABELA 12.</b>	Coeficiente de correlação e valor de P das variáveis MIAI, MLAL e alto e baixo potencial mitocondrial, com a geração de ânion superóxido, peroxidação lipídica e danos no DNA no sêmen pós-descongelamento.....	<b>30</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>BODIPY</b> <sub>11</sub> <sup>58</sup> 1/591	(4,4 –Difluoro – 5- (4-phenyl1,3-butadienyl)-4-bora-3 <sup>a</sup> ,4 <sup>a</sup> - diaza-s-indacene-3-undecanoic acid)
<b>BP</b>	“band pass”
<b>CCPS</b>	Centro de colheita e processamento do sêmen
<b>CCP</b>	Carbonil cianida-m-clorofenilhidrazona
<b>°C</b>	Graus centígrados
<b>DCFH</b>	Diacetato de fluoresceína
<b>DNA</b>	Ácido desoxiribonucléico
<b>DHE</b>	Dihidroetídio
<b>DIC</b>	Contraste por interferência diferencial
<b>DTT:</b>	Diidrotreitol
<b>FITC</b>	Isoticianato de fluoresceína
<b>FITC-PSA</b>	Aglutinina de <i>Pisum sativum</i> conjugada a isoticianato de fluoresceína
<b>KCL</b>	Cloreto de potássio
<b>LP</b>	“Long pass”
<b>MDA</b>	Malondialdeído
<b>±</b>	Mais ou menos
<b>&gt;</b>	Maior
<b>&lt;</b>	Menor
<b>(<math>\bar{x}</math>)</b>	Média
<b>MOT</b>	Motilidade total
<b>mg</b>	Miligramas
<b>mV</b>	Milivolt
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>μL</b>	Microlitro
<b>μM</b>	Micromolar
<b>MIAI</b>	Membrana íntegra acrossoma íntegro

<b>MLAI</b>	Membrana lesada acrossoma íntegro
<b>MIAL</b>	Membrana íntegra acrossoma lesado
<b>MLAL</b>	Membrana lesada acrossoma lesado
<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	Ânion de superóxido
<b>OH</b>	Radical hidroxila
<b>ROO-</b>	Radical peroxila
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>8OHdG</b>	8-OH-2'-deoxiguanina
<b>JC1</b>	Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1,3,3-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina
<b>sd</b>	Desvio padrão
<b>SAS</b>	“Statistical Analyses System”
<b>TBARS</b>	“thiobarbituric acid reactive species”
<b>TBA</b>	Ácido Tiobarbitúrico
<b>TCA</b>	Ácido Tricloroacético



## INFLUÊNCIA DOS DANOS OXIDATIVOS NA QUALIDADE ESPERMÁTICA EM BOVINOS DE DIFERENTES IDADES

**RESUMO** - O estudo teve por objetivo avaliar o sêmen criopreservado de touros da raça Nelore de diferentes idades e verificar se a qualidade espermática declina com o avanço da idade e se geração espontânea intracelular de superóxido, peroxidação lipídica e danos no DNA estão envolvidos neste processo em decorrência da susceptibilidade ao estresse oxidativo durante o envelhecimento. Para isso, foram utilizados três ejaculados de 40 touros, subdivididos em três faixas etárias: Jovens de 1,8 a 2 anos (n= 27 partidas), Adultos de 3,5 a 7,0 anos (n= 52 partidas) e Senis de 8,0 a 14,3 anos (n= 34). Os touros jovens apresentaram altos valores de motilidade, integridade da membrana e acrossoma e de alto potencial mitocondrial comparado com touros adultos e senis ( $p < 0,05$ ). Houve correlação positiva entre a idade e os parâmetros considerados indesejáveis tais como baixo potencial mitocondrial, membrana lesada, acrossoma lesado e danos oxidativos no DNA ( $p < 0,05$ ) e negativa com alto potencial mitocondrial, membrana íntegra e acrossoma íntegro ( $p < 0,05$ ), indicando redução da qualidade espermática com o envelhecimento. A geração de superóxido, peroxidação lipídica (BodipyC<sub>11</sub><sup>581/591</sup>) não apresentou diferença significativa entre a idade e os parâmetros referentes à qualidade espermática ( $p > 0,05$ ). A concentração de TBARS foi menor em touros jovens quando comparado aos adultos, mas diferenças não foram observadas em touros senis ( $p > 0,05$ ). Danos oxidativos no DNA correlacionaram negativamente com a variável membrana e acrossoma íntegro ( $r = 0,33$ ,  $p < 0,03$ ) e positivamente com os valores de baixo potencial mitocondrial ( $r = 0,38$ ,  $p < 0,01$ ). A qualidade espermática declina com o avanço da idade e não está relacionada com a geração de superóxido e peroxidação lipídica (TBARS e BodipyC<sub>11</sub><sup>581/591</sup>) no sêmen criopreservado. No entanto, alta porcentagem de danos oxidativos no DNA no sêmen de touros senis e sua relação com integridade da membrana e potencial mitocondrial indicam o envolvimento de outras ROS na redução da qualidade espermática e aumento da susceptibilidade ao estresse oxidativo durante o envelhecimento.

**Palavras-chave:** Idade, touros, criopreservação, sêmen, DNA, estresse oxidativo.

## INFLUENCE OF OXIDATIVE DAMAGE IN BOVINE SPERM QUALITY OF DIFFERENT AGES

**ABSTRACT** – The aim of this study was to evaluate sperm quality of frozen-thawed semen samples of Nelore Bulls of different ages and verify if the quality declines with age and if it is associated with the spontaneous generation of intracellular superoxide, lipid peroxidation and DNA damage. 40 bulls were divided into three age groups: Young 1,8 to 2 years (n = 27 samples), Adults 3.5 to 7.0 years (n = 52 samples) and Senile , from 8 to 14.3 years (n = 34 samples). Young bulls showed higher values of motility, membrane integrity and acrosome and high mitochondrial potential compared to adults and senile bulls ( $P < 0.05$ ). There was a positive correlation between age and undesirable parameters such as low mitochondrial potential , damaged membrane, damaged acrosome and oxidative DNA damage ( $P < 0.05$ ). There was also a negative correlation with high potential mitochondrial, membrane integrity and acrosome integrity ( $P < 0.05$ ). These results indicate a reduction in sperm quality with aging. The generation of superoxide and lipid peroxidation (BodipyC11581/591) showed no significant differences between age and parameters related to sperm quality ( $P > 0.05$ ). The TBARS concentration was lower in young bulls compared to adults, but no differences were observed in senile bulls ( $P > 0.05$ ). Oxidative DNA damage correlated negatively with membrane and acrosome integrity ( $r = 0.33$ ,  $P < 0.03$ ) and positively with low mitochondrial potential ( $r = 0.38$ ,  $P < .01$ ). The sperm quality declines with aging and is not related to superoxide generation and lipid peroxidation (TBARS and BodipyC11581/591) in frozen semen. However, high percentage of oxidative DNA damage indicates the involvement of other ROS (reactive oxygen species) which reduces sperm quality and increases susceptibility to oxidative stress during aging.

**Keywords:** Age, bulls, cryopreservation, semen, DNA, oxidative stress.

## I. INTRODUÇÃO

A fertilidade de touros é essencial para a indústria da inseminação artificial (HALLAP et al., 2004), pois é por meio do sêmen que o touro contribui com o melhoramento genético de seus descendentes. Desta forma, o conhecimento dos fatores que afetam a produção e a qualidade espermática contribui para melhorar a eficiência reprodutiva e, portanto, a produtividade e rentabilidade de centros de inseminação artificial (FUERST-WALTL et al., 2005).

Diversos fatores tais como: sazonalidade (NICHI et al., 2006; KOIVISTO et al., 2009) nutrição, manejo da fazenda (PACHECO et al., 2007), grupo genético e principalmente idade dos reprodutores influenciam na qualidade espermática de touros (BRITO et al., 2002).

Sabe-se que determinadas características como volume do ejaculado, número total de espermatozoides e motilidade são aprimoradas à medida que os touros amadurecem (BRITO et al., 2002; HALLAP et al., 2004; FRENEAU et al., 2006) como também contribuem com a qualidade pós descongelação de amostras criopreservadas (HALLAP et al., 2006). No entanto, durante o envelhecimento em touros ocorre tendência na redução da concentração espermática e motilidade, o que tem sido associado à degeneração testicular (KUMI-DIAKA et al., 1981; KELSO et al., 1997).

Em humanos diversos trabalhos relatam o declínio dos parâmetros seminais (volume do ejaculado, motilidade e morfologia normal) com o envelhecimento (CENTOLA et al., 1999; KIDD et al., 2001; CHEN et al., 2003). Esse cenário normalmente é refletido pelo estilo de vida, como o uso de medicamentos, cigarros e álcool, que reforçam a queda da qualidade seminal com o avanço da idade (ESKENAZI et al., 2003).

Atualmente, após descoberta da participação das espécies reativas de oxigênio (ROS do inglês: reactive oxygen species) e sua patofisiologia durante o envelhecimento, sugere-se que o acúmulo dessas substâncias pode ser um dos fatores associados à deterioração da função reprodutiva. (ANGELOPOULOU et al., 2009).

Em humanos e roedores estudos indicam a participação das ROS na redução da qualidade espermática e fecundidade com o avanço da idade. O aumento da ROS e a redução da capacidade antioxidante do sêmen são um dos principais fatores envolvidos na patogênese da infertilidade e no atraso da paternidade (WEIR & ROBAIERE, 2006; COCCUZA et al., 2008).

A célula espermática é extremamente susceptível aos danos induzidos pelas ROS. Substâncias oxidantes adicionadas ao sêmen prejudicam a viabilidade, motilidade, potencial mitocondrial e estão em alto grau relacionados com o nível de apoptose e danos no DNA nuclear e mitocondrial do espermatozoide (BAUMBER et al., 2000; DURU et al., 2000; WANG et al., 2003; VENKATESH et al., 2009).

Poucas pesquisas relacionam a idade e as consequências da ROS na qualidade espermática em bovinos (KELSO et al., 1997). Os trabalhos existentes geralmente associam o efeito das ROS e o uso de antioxidantes nos protocolos de criopreservação (CHATERJEE et al., 2001; BUCAK et al., 2010). Além disso, pouco se sabe sobre a geração espontânea de ROS, peroxidação lipídica e danos oxidativos no DNA do sêmen bovino (BROWERS & GADELLA, 2003).

Tendo em vista a escassez de dados e a dificuldade da avaliação espermática em pacientes humanos de diferentes faixas etárias devido à questões éticas, os animais podem servir como modelo de possíveis alterações espermáticas envolvendo a idade. O objetivo deste trabalho foi avaliar o sêmen criopreservado de touros da raça Nelore de diferentes idades e verificar se a qualidade espermática declina com o avanço da idade e se a geração espontânea intracelular de superóxido, peroxidação lipídica e danos no DNA estariam envolvidos neste processo em decorrência da susceptibilidade ao estresse oxidativo durante o envelhecimento.

## II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nas últimas décadas, há uma constante busca referente ao papel fisiológico do oxigênio no organismo aeróbico, pois o mesmo oxigênio que é essencial à vida também produz derivados tóxicos como as ROS. (De LAMIRANDE & O'FLAHERTY, 2008).

As ROS englobam grupo de moléculas tais como: ânion supéroxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxila ( $OH^-$ ), radical peroxila ( $ROO^-$ ) e o não-radical peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (HALLIWELL & GUTTERIDGE; 1999), subprodutos imprescindíveis durante as reações enzimáticas de sinalização inter e intracelular. (BANSAL & BILASPURI, 2011).

A reatividade dessas moléculas e seu poder oxidante são influenciados por suas características próprias. O  $O_2^-$  tem vida curta e não é capaz de atravessar a membrana biológica, mas quando ocorre permeabilidade da mesma, pode ser extremamente danoso no local onde foi produzido (AITKEN & BENNETTS, 2006). Além disso,  $O_2^-$  pode converter-se espontaneamente ou enzimaticamente em outros ROS, como o  $H_2O_2$  (AITKEN & BENNETTS, 2006), que tem vida longa, capacidade de atravessar membranas biológicas e gerar o radical  $OH^-$ , que é considerado o radical mais potente e mais danoso no sistema biológico. (SILVA et al., 2010).

Desta forma, as ROS são capazes de induzir danos oxidativos em lipídeos, proteínas e DNA, pois utilizam esses componentes como substratos para a geração de novas ROS (SILVA et al., 2006) quando mecanismos antioxidantes não estiverem disponíveis (SILVA; CHAVEIRO, 2010).

Os antioxidantes em geral são responsáveis em neutralizar ou suprimir a produção excessiva das ROS e conseqüentemente atenuar seus efeitos danosos (AGARWAL et al., 2003; SILVA & CHAVEIRO, 2010). Quando ocorre desequilíbrio entre ROS e antioxidantes instala-se condição conhecida como estresse oxidativo (AGARWAL et al., 2003), envolvido em diversas doenças como aterosclerose,

doenças neurodegenerativas e inclusive na fisiopatologia do envelhecimento (ANGELOUPOU et al., 2009; DESAI et al., 2009).

O estresse oxidativo vem sendo associado a uma ampla gama de patologias que afligem a função reprodutiva, resultando na infertilidade masculina (AGARWAL et al., 2003; AITKEN et al., 2012). Sendo o ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radical peroxil e hidroxil os radicais livres mais envolvidos nas implicações da biologia reprodutiva (OGBUEWU et al., 2010).

Os espermatozoides são altamente susceptíveis aos ROS devido a alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados na membrana (JONES et al., 1978), a restrita localização de enzimas antioxidantes no citoplasma (AGARWAL et al., 2003) e por serem capazes de produzir ROS através da atividade mitocondrial localizada em sua peça intermediária (KOOBERS et al., 2008).

Substâncias antioxidantes enzimáticas (superóxido dismutase, peroxidase) e não-enzimáticas (catalase, ácido ascórbico, alfa tocoferol, taurina e albumina) estão presentes na célula espermática e no plasma seminal para prevenir o estresse oxidativo (ALVAREZ & STOREY, 1993; OGBUEWU et al., 2010).

No entanto, biotecnologias como a criopreservação reduzem os níveis de antioxidantes. Segundo Bilodeau et al. (2000), o sêmen congelado perde cerca de 78% de glutathione peroxidase e 50% de superóxido dismutase, reduzindo a viabilidade do sêmen em consequência do estresse oxidativo (CHATERJEE & GAGNON, 2001).

Altas concentrações produzidas pelos próprios espermatozoides (AITKEN & CLARKSON, 1987) ou a combinação de agentes oxidantes como o sistema xantina oxidase ou  $H_2O_2$  (BAUMBER et al., 2000) comprometem a motilidade, potencial mitocondrial, viabilidade e integridade do DNA espermático (De LAMIRANDE et al., 1992; BAUMBER et al., 2000; WANG et al., 2003; ZUBKOVA et al., 2005).

Tendo em vista que altas concentrações ROS afetam negativamente a viabilidade espermática, baixas concentrações são necessárias para que ocorram eventos fisiológicos tais como reação acrossomal, capacitação, e interação do espermatozoide e oócito (DeLAMIRANDE & O'FLAHERTY, 2008; GONÇALVEZ et al., 2010; RODRIGUEZ et al., 2011). Porém, cabe ressaltar que essas concentrações são referentes a níveis basais e que adição de substâncias

antioxidantes no intuito de manter os níveis de ROS baixos podem prejudicar tais eventos fisiológicos como a reação acrossomal (O'FLAHERTY et al., 2003).

O dano mais comum envolvendo as ROS é a peroxidação lipídica, definida como processo de degradação autocatalítica da membrana plasmática (HALLIWELL & CHIRICO, 1993). Esta reação gera peróxidos lipídicos que levam a redução da fluidez da membrana plasmática e favorecem a decomposição de aldeídos citotóxicos como o malondealdeído, produto final da peroxidação lipídica (LIMA & ABDALA, 2001; SILVA et al., 2006),

A mensuração da peroxidação lipídica indica a extensão dos danos oxidativos. Pode ser utilizada para mensurar os danos causados durante o processo de criopreservação e conseqüentemente redução da fertilidade (BROWERS & GADELLA, 2003; AITKEN et al., 2007) como também avaliar a susceptibilidade de determinadas espécies animais aos danos oxidativos (FERRUSOLA et al., 2009).

O sêmen bovino *in natura* é considerado mais resistente aos danos peroxidativos apresentando apenas 2% de células peroxidadas, mas após descongelação e posterior retirada do meio diluidor somente 60% da população são viáveis (BROWERS & GADELLA, 2003). Mesmo assim, sua resistência à peroxidação após criopreservação ainda é superior quando comparado a outras espécies como em bubalinos (NAIR et al., 2006).

A peroxidação lipídica correlaciona negativamente com a motilidade e viabilidade espermática em humanos (AITKEN et al., 2007) ovinos (AWADA et al., 2009) e bubalinos (KARDIVEL et al., 2009). Acredita-se que a redução da motilidade pode ser ocasionada pelo aumento da permeabilidade da membrana plasmática em resposta à peroxidação levando a perda de íons responsáveis pelo controle do movimento espermático (KARDIVEL et al., 2009) ou ainda possa ser provocada pela depleção de ATP (adenosina trifosfato) (De LAMIRANDE & GAGNON, 1992; ARMSTRONG et al., 1999).

Além da peroxidação lipídica, as ROS podem danificar o DNA espermática levando ao aumento significativo de mutações, deleções, rearranjo de cromossomos entre outros problemas (DURU et al., 2000; DE IULLIS et al., 2009), repercutindo negativamente no desenvolvimento embrionário, favorecendo a incidência de abortos e o risco de doenças na prole (MAHFOUZ et al., 2009;

AITKEN & De IULLIS, 2010). Em bovinos as adições de substâncias oxidativas no sêmen, resultaram na formação de embriões com competência reduzida (HENDRICKS & HANSAN, 2010)

O estresse oxidativo tem sido proposto como principal fator que leva ao aumento da fragmentação do DNA e prejuízos no remodelamento da cromatina (De IULLIS et al., 2009; SUBRAMANI & CHAUDHURY, 2010). Estes danos normalmente ocorrem durante o trânsito epididimário e são induzidos pelo radical hidroxil e óxido nítrico resultando na formação da 8-OH-guanina e 8-OH-2-deoxyguanosina (8-OHdG) (SAKKAS & ALVAREZ, 2010).

A 8-OHdG é um biomarcador do estresse oxidativo e está altamente correlacionada com a fragmentação de DNA em espermatozoides humanos (De IULLIS et al., 2009), inclusive em pacientes normozoospermicos, porém, inférteis (SUBRUNAMI & CHAUDHURY, 2010). Atualmente o acúmulo de danos de DNA nas células germinativas masculinas vem sendo particularmente associado com a formação de bases modificadas (8 OHdG) e relacionado à idade, bem como ao aparecimento de espermatozoides com altos índices de lesões no DNA (PAUL et al., 2011).

O envelhecimento resulta no acúmulo de danos oxidativos em diversos tecidos que culminam com perda funcional da célula (MARTIN & GROTEWIEL, 2006). E estes danos normalmente ocorrem devido a diversos fatores como o aumento da geração de espécies oxidantes, redução da capacidade antioxidante, redução da reparação dos danos oxidativos, diminuição da degradação de macromoléculas oxidadas ou a combinação destes mecanismos (SOLAH & WEINDRUCH, 1996; MARY et al., 2004).

No sêmen humano algumas dessas associações foram observadas e relacionadas com a idade. Níveis elevados de ROS foram significativamente aumentados em ejaculados de homens com mais de 40 anos quando comparados aos mais jovens, contribuindo negativamente com a concentração espermática e motilidade (COCCUZA et al., 2008).

Weir e Robaire (2006) testaram a influência da idade em relação à atividade antioxidante em espermatozoides de ratos Brown Norway. Verificaram que ratos senis (21 meses) apresentaram redução da atividade antioxidante e aumento da



produção de ROS quando comparado a animais jovens (4 meses). Zubkova et al. (2005) atribuíram essa susceptibilidade ao estresse oxidativo, já que a cromatina espermática se altera ficando mais frouxa e conseqüentemente menos resistente ao ataque das ROS durante o envelhecimento.

## **2.1 Métodos utilizados para mensurar o estresse oxidativo**

### **2.1.1 Mensuração de ROS**

A quimioluminescência é o método amplamente utilizado para avaliar o nível extracelular e intracelular de ROS e é baseado em duas sondas fluorescentes, o luminol e lucigenina. O luminol avalia tanto o nível extracelular e intracelular de  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  e  $OH^-$ , enquanto, a lucigenina detecta apenas o nível extracelular de  $O_2^-$  e  $OH^-$  (KOBAYASHI et al., 2001; AGARWAL et al., 2004). No entanto, esta técnica apresenta grandes limitações como o alto volume e concentração espermática, a incapacidade de detectar apenas um tipo de ROS, e de diferenciar espermatozoides viáveis de apoptóticos (MAHFOUZ et al., 2009).

O uso da citometria de fluxo tem sido proposto para avaliar o nível intracelular de ROS, por meio de sondas fluorescentes específicas, tais como, o dihidroetídio (DHE) para o  $O_2^-$  e o diacetato de fluoresceína (DCFH-DA) para  $H_2O_2$ . A grande vantagem é a possibilidade de mensurar múltiplos parâmetros simultaneamente e a contagem de no mínimo 10.000 células (MAHFOUZ et al., 2009).

O DHE é produto da redução do etídio com baixa fluorescência que, quando atacado por ROS, produz fluorocromo ligado ao DNA (etídio e 2 hidroxietídio) fazendo com que o núcleo fluoresça em vermelho. Esta molécula não pode fornecer informações sobre origem subcelular de ROS, pois somente é o núcleo que fluoresce. No entanto, é validado como teste potencialmente sensível à produção de ROS intracelular em humanos (DE IULIIS et al., 2006), equinos (BURNAUGH et al., 2007) e macacos (McCARTHY et al., 2009), mas ainda não foi testada no sêmen bovino.

### 2.1.2 Avaliação da peroxidação lipídica

O método intensamente utilizado para avaliar a peroxidação lipídica de espermatozoides mamíferos é o TBARS (reação ao ácido tiobarbitúrico) (REBOLLEDO et al., 2010). Essa técnica envolve a mensuração da concentração de malondialdeído (MDA), produto final da peroxidação lipídica. Neste processo duas moléculas de ácido tiobarbitúrico reagem com uma molécula de MDA, resultando em cromógeno de coloração rósea, que permite a quantificação do produto em espectrofotometria (OHKAWA et al., 1979). Entretanto, é considerado método indireto da mensuração pois pode reagir com outras moléculas biológicas e não é capaz de identificar o local subcelular das alterações (PAP et al., 1999).

Recentemente alguns autores (FERRUZOLA et al., 2009; THUWANUT et al., 2009; REBOLLEDO et al., 2010) utilizaram o BODIPY C<sub>11</sub><sup>581/591</sup>, sonda fluorescente lipofílica análoga ao ácido graxo, que tem a propriedade de se fundir à membrana plasmática e fluorescer após peroxidação lipídica. A sonda fluoresce em vermelho quando a membrana está intacta e verde quando ocorre oxidação após o ataque de radicais peroxil e alkoxil (DRUMMEN et al., 2002). Esta sonda apresenta a vantagem de ser um método qualitativo e quantitativo, pois é possível contabilizar e localizar *in situ* a peroxidação pela microscopia confocal e quantificá-la por meio da citometria de fluxo (BROWERS & GADELLA, 2003).

Diversos trabalhos mostram a eficácia e sensibilidade do BODIPY C<sub>11</sub><sup>581/591</sup> para detecção da peroxidação lipídica em células espermáticas de gatos (THUWANUT et al., 2009), veados (REBOLLEDO et al., 2010), equinos (FERRUZOLA et al., 2009), bovinos (BROWERS & GADELLA, 2003) e humanos (AITKEN et al., 2007).

### 2.1.3 Avaliação de danos oxidativo no DNA

Para verificar a integridade da cromatina existem diversas técnicas, como o teste “Sperm Chromatin Structure Assay” (SCSA) (EVENSON et al., 2002), que avalia a suscetibilidade da cromatina à desnaturação *in situ* e a técnica de TUNEL que detecta porcentagem de células com danos na cromatina (MITCHELL et al., 2010). Entretanto, o único teste e o mais específico relacionado a danos do DNA causado pelos radicais livres, é o teste da 8 oxoguanina (DE IULIIS et al., 2009).

A oxidação das bases nitrogenadas ocorre primeiramente e preferencialmente na guanina, os produtos finais são bases modificadas, a 8-OH-guanosina e 8-OH-2'-deoxiguanina (8-OHdG) que passam a se ligar a timina, quando deveriam se ligar a citosina, aumentando o risco de mutações (COMHAIRE et al., 2000). A formação dessas bases também enfraquece o esqueleto entre a base e o açúcar (KOOBERS et al., 2008) e pode causar a fragmentação da fita de DNA (CUI et al., 2000).

Essas bases têm demonstrado ser um bio-marcador importante (NI et al., 1997; SHEN et al., 1999; SILVA & GADELLA, 2006), mas sua utilização dependia de equipamentos especiais e caros como a cromatografia líquida de alta eficiência. No entanto, pesquisas mais recentes verificaram que anticorpos anti 8-oxoguanina marcados com *isotiocianato de fluoresceína* (FITC) permitem a quantificação destas bases pela microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo (SILVA, 2006; SILVA & GADELLA, 2006).

### III. HIPÓTESE

A qualidade espermática no sêmen criopreservado de touros da raça Nelore de diferentes idades declina com o avanço da idade e está associada com a geração espontânea intracelular de superóxido, peroxidação lipídica e danos no DNA.

### IV. OBJETIVOS

Os objetivos específicos, para touros jovens, adultos e senis, foram avaliar:

- Motilidade, vigor, concentração, morfologia espermática;
- Integridade da membrana plasmática e acrossoma, potencial mitocondrial;
- Geração intracelular espontânea de superóxido;
- Susceptibilidade à peroxidação lipídica espontânea e induzida (BodipyC<sub>11</sub><sup>581/591</sup> e TBARS, respectivamente);
- Danos oxidativos no DNA;
- Correlacionar os resultados dos parâmetros selecionados com a idade

## V. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Seleção dos animais

Foi realizado um estudo casualizando 40 touros *Bos indicus* da raça Nelore provenientes do mesmo centro de colheita e processamento do sêmen (CCPS) (latitude 21°04'52" e longitude 48°02'24"). Os animais foram colhidos duas vezes por semana pelo método da vagina artificial completando três colheitas por animal, sendo subdivididos em três faixas etárias: Grupo Jovens de 1,8 a 2 anos, Grupo Adultos de 3,5 a 7 anos e Grupo Senis de 8 a 14,5 anos (Tabela 1).

O sêmen colhido foi industrializado conforme protocolo padrão do CCPS em palhetas de 0,25mL (meio diluidor à base de tris, ácido cítrico, frutose, penicilina G potássica, estreptomicina, lincospectin, glicerol, gema de ovo e água destilada) e estocado em nitrogênio líquido até a avaliação. Todos os procedimentos de análise do sêmen foram realizados no Laboratório de Reprodução Animal do Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal da FMV - UNESP – campus de Araçatuba.

**TABELA 1.** Distribuição dos animais por grupos experimentais determinados pela idade (anos: jovens, adultos e senis) de touros da raça Nelore, média e desvio padrão das idades e idade mínima e máxima dos animais.

Grupo	Nºpartidas (Nºtousos)	Média ± sd	Mínima	Máxima
Jovens	27(9)	1,9±0,1	1,8	2,0
Adultos	52(19)	4,7±1,0	3,5	7,0
Senis	34(12)	10,1±2,0	8,0	14,3

### 5.2 Análises físicas e funcionais dos espermatozoides

Para as avaliações descritas a seguir o sêmen foi descongelado, em água a 35°C durante 20 segundos. As avaliações microscópicas foram realizadas pelo microscópio Olympus BX61 (Olympus, Tokyo, Japão), equipado com campo claro, contraste de fase, contraste de interferência diferencial (DIC) e epifluorescência. A citometria de fluxo foi realizada pelo equipamento Attune® (Applied Biosystems by Life Technologies, Grand Island, EUA), equipado com lasers de 488nm e de

405nm, filtros de emissão BL1 530/30nm “band pass” (BP), BL2 575/24nm BP, BL3 640nm “long pass” (LP) e VL1 450/40nm BP, VL2 522/30nm BP e VL3 603/48nm BP. A espectrofotometria foi realizada no equipamento Genesys 10 UV-Visível (Thermo Scientific, EUA), equipado com sistema óptico de duplo feixe com faixa de comprimento de onda entre 190 a 1100nm e seis cubetas de quartzo (10mm<sup>3</sup>).

### **5.3 Motilidade e Vigor Espermático**

A motilidade e vigor foram avaliados imediatamente após a descongelação. Foi colocada uma gota de sêmen em lâmina coberta por lamínula pré-aquecidas a 37°C, e observada em microscópio de contraste de fase (Olympus BX61, 200x). A motilidade foi determinada pela estimativa visual da porcentagem de células em movimento.

O vigor foi avaliado de acordo com a velocidade do movimento progressivo dos espermatozoides e classificado de 0 a 5, sendo 0 o mais lento e 5 o mais rápido (FONSECA et al., 1992).

### **5.4 Concentração**

Realizou-se contagem das células em câmara de Neubauer à microscopia de contraste de fase (Olympus BX61, 200x), Para tanto, foram diluídos 20µL de sêmen em 1mL de solução formol-salina (FONSECA et al., 1992).

### **5.5 Morfologia Espermática**

Para a contagem das anormalidades espermáticas foi utilizada a técnica de câmara úmida, onde uma gota de sêmen diluído em solução de KCl (MITCHELL, J.R.- comunicação pessoal ) foi depositada em lâmina coberta por lamínula. Foram contadas 200 células em microscopia de interferência diferencial de fase – DIC (Olympus BX61, 1000X). O número de anormalidades morfológicas foi expresso em porcentagem de acordo com a classificação de Blom (1973).

### 5.6 Avaliações da Integridade de Membranas – PI e FITC-PSA

Para avaliar simultaneamente a integridade do acrossoma e da membrana plasmática foram utilizadas as sondas fluorescentes aglutinina de *Pisum sativum* conjugada com isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA, Sigma, St. Louis, M.O., E.U.A.), que têm a propriedade de se ligar ao conteúdo acrossomal, fluorescendo em verde (CASEY et al., 1993); e o iodeto de propídio (PI, Sigma, St. Louis, M.O., E.U.A.), que não é permeável a membrana íntegra, se ligando ao DNA e fluorescendo em vermelho quando a membrana estiver lesada (ARRUDA & CELLEGHINI, 2003).

Para a coloração, uma palheta de cada partida foi descongelada (35°C/20 segundos) e o sêmen foi diluído para  $2 \times 10^6$  espermatozoides em 200µL de PBS (“phosphate buffer solution”) e adicionados 3µL (0,2mg/mL) de PI e 50 µL (100µg/mL) de FITC-PSA. Após incubação por oito minutos a 37°C no escuro, as amostras foram lidas em citômetro de fluxo (Attune® - Applied Biosystems by Life Technologies, Grand Island, EUA), utilizando a excitação do laser de argônio (488nm) e leitura simultânea em BL1 (530/30) e BL3 (640LP). Para realização do controle positivo e compensação, amostras foram submetidas à três ciclos de “Flash Frozen” (CELLEGHINI et al., 2010) com objetivo de promover lesão de membranas e conseqüente coloração positiva (vermelha) do PI e do FITC-PSA (verde). Os resultados foram classificados de acordo com a integridade simultânea da membrana e do acrossoma, ou seja, membrana íntegra e acrossoma íntegro (MIAI), membrana íntegra e acrossoma lesado (MIAL), membrana lesada e acrossoma íntegro (MLAI) e membrana lesada e acrossoma lesado (MLAL). Para o registro de imagens ilustrativas da integridade da membrana e do acrossoma, 8µL dos espermatozoides corados foram colocados entre lâmina e lamínula e fotografados em microscópio de epifluorescência (Olympus BX61, Tokyo, Japão), utilizando filtro com excitação de 460-570nm e emissão de 460-610nm.

### 5.7 Avaliação do Potencial Mitocondrial – JC-1

A avaliação do potencial mitocondrial foi realizada pela utilização da sonda fluorescente iodeto de 5, 5', 6, 6' – tetracloro - 1, 1, 3, 3' – tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1, Sigma, St. Louis, M.O., E.U.A.). Esta sonda

é capaz de se ligar seletivamente à mitocôndria e as mudanças de coloração são reversíveis, do verde ao alaranjado de acordo com o aumento do potencial de membrana acima de valores de 80 a 100mV. Esta propriedade é reversível devido à formação de agregados na membrana polarizada que causam a mudança da emissão de luz de 530nm (emissão das formas monoméricas de JC-1) para 590nm (emissão dos J-agregados), quando excitados a aproximadamente 488nm (COSSARIZZA et al., 1993; GRAVANCE et al., 2000).

Para coloração uma palheta de cada partida foi descongelada (35°C/20s) e o sêmen diluído em PBS para  $2 \times 10^6$  espermatozoides em 200µL, foram adicionados 6µL (153µM) de JC-1. As amostras foram incubadas por 8 minutos a 37°C no escuro e lidas em citômetro de fluxo (Attune® - Applied Biosystems by Life Technologies, Grand Island, EUA), utilizando a excitação do laser de argônio (488nm) e leitura simultânea em BL1 (530/30nm) e BL2 (575/24nm). Para realização do controle das células somente com baixo potencial mitocondrial, as amostras foram incubadas com 10µM de carbonil cianida-m-clorofenilhidrazona (CCCP, Sigma, St. Louis, M.O., E.U.A.) a 37°C durante 30 minutos e depois coradas com JC-1 conforme o protocolo descrito anteriormente. O CCCP é um agente de desacoplamento, resgata os prótons despolarizando a membrana mitocondrial (BREWIS et al., 2000).

### **5.8 Avaliação da Geração de Ânion Superóxido – DHE**

As amostras descongeladas foram centrifugadas para retirada do meio diluidor e ajustadas a uma concentração de  $2 \times 10^6$  espermatozóides. As amostras foram suspensas em 160µL de PBS, adicionando 1µL de Live/Dead Aqua® e incubadas por 15 minutos a 37°C, após este período 20µL (2µM) de DHE foram adicionados e incubados por mais 15 minutos a 37°C. As amostras incubadas foram lavadas (500g) para retirar o excesso e ressuspensas em 1mL de PBS. O protocolo descrito acima foi realizado conforme De Iuliis et al. (2006). As amostras controle positivo foram incubadas com 50µM de ácido araquidônico por 60 minutos a 37°C, para induzir a produção de superóxido (DE IULIIS et al., 2009).

A leitura foi realizada pela citometria de fluxo na qual 10.000 eventos correspondentes a espermatozóides foram contabilizados. A fluorescência do DHE



foi excitada pelo laser 488nm no filtro BL2 (575/24nm band pass) e o Live/Dead Aqua® pelo laser 405nm no filtro VL2 (522/30nm band pass).

### **5.9 Ensaio de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico – TBARS**

Para a determinação da susceptibilidade à peroxidação lipídica uma palheta de cada touro foi descongelada e 200µL de sêmen foram lavados e incubados com 50µL (4mM) de sulfato de ferro e 50µL (20mM) de ascorbato de sódio a 37°C por 90 minutos. Após a incubação foi adicionado ácido tricloroacético gelado a 10% (TCA10%) na proporção 1:2. As amostras foram centrifugadas a 18.000g por 10 minutos e o sobrenadante recuperado e congelado (-20°C) para posterior leitura.

No dia da leitura, uma alíquota de 800µL de ácido tiobarbitúrico a 1% (TBA) dissolvido em hidróxido de sódio (NaOH) a 0,05N foi acrescida a 800µL do sobrenadante anteriormente congelado. A mistura foi submetida à incubação em banho fervente (100°C) por 15 minutos e posteriormente resfriada em gelo (0°C) por 20 segundos para interromper a reação. Realizou-se varredura de comprimento de onda fixo de 532nm no espectrofotômetro. Curva padrão de malondealdeído (MDA), produto final da peroxidação lipídica, foi previamente estabelecida em nosso laboratório e a concentração de TBARS foi determinada por meio do coeficiente de extinção molar do MDA no valor  $1,56 \times 10^5 \times M^{-1}$  (BUEGE & AUST, 1978). O índice de peroxidação lipídica foi expresso em nanogramas de TBARS/10<sup>6</sup> espermatozóides.

### **5.10 Avaliação da Peroxidação Lipídica – BODIPY- C<sub>11</sub><sup>581/591</sup>**

Para a coloração as amostras de cada partida foram descongeladas e ajustadas para a concentração de  $2 \times 10^6$  espermatozóides. O sêmen foi lavado pela centrifugação (500g) e ressuspenso em 160µL de PBS, após isso 20µL (5µM) de Bodipy - C<sup>581/591</sup> foi adicionado e incubado por 30 minutos a 37°C. Faltando 8 minutos do período de incubação, 1µL(2mg/mL) de iodeto de propídeo foi adicionado para avaliar a viabilidade celular. Esta sonda não é permeável a membrana íntegra, mas se liga ao DNA produzindo fluorescência vermelha quando a mesma estiver lesada (ARRUDA & CELLEGHINI, 2003). Após a adição das sondas fluorescentes,

as amostras foram lavadas e ressuspensas em 1mL de PBS. O protocolo descrito acima foi baseado conforme Aitken et al. (2007) e Browers e Gadella (2003).

Os 10.000 eventos correspondentes a espermatozoides foram excitados pelo laser de argônio de 488nm. A fluorescência verde/laranja das amostras peroxidadas (Bodipy - C<sup>581/591</sup>) foi lida no filtro BL1 (530/30nm band pass). Já a fluorescência do iodeto de propídeo foi detectada no filtro BL3 (640nm long pass). O controle positivo foi realizado incubando uma amostra espermática em peróxido de hidrogênio (500µM) por 60 minutos a 37°C.

### **5.11 Avaliação dos Danos de DNA causados por ROS – 8 - OHdG**

Para a avaliação da oxidação da guanina foi utilizado protocolo descrito por DeIULLIS et al. (2009). O sêmen de uma palheta descongelada de cada partida foi lavada com PBS e ressuspensa em 100µL de DTT (2mM) e incubada a 37°C por 45 minutos. As amostras foram lavadas com PBS e foram adicionados 100µL de paraformaldeído 4% em 100µL de PBS, mantidas a 4°C por 15 minutos. Após a fixação e lavagem com PBS as células foram incubadas em 100µL de Triton X100 a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida foram lavadas com a solução "Wash solution" contida no "kit" 8OHdG, diluída em água destilada a 1:25. Em seguida as amostras foram incubadas durante 60 minutos à temperatura ambiente com uma solução contendo uma parte da solução de anticorpo anti-8-OHdG marcado com FITC diluída em nove partes da solução de lavagem. As amostras coradas foram lavadas e ressuspensas em 1mL de PBS.

Após o protocolo de coloração, a leitura foi realizada pela citometria de fluxo, onde 10.000 eventos correspondentes a espermatozoides foram excitados pelo laser de argônio de 488nm e lidas no filtro BL1 (530/30nm band pass). O controle positivo foi realizado incubando uma amostra espermática em DDT por 45 minutos e, em seguida, acondicionada em peróxido de hidrogênio e sulfato ferroso por 60 minutos.

## VI. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi definida como hipótese nula ( $H_0$ ) a ausência de diferenças entre a qualidade espermática de amostras criopreservadas de touros de diferentes faixas etárias.

Os dados em porcentagem (exceto vigor, e dados de velocidade) foram transformados em arcoseno  $\sqrt{\%}$  para obter a distribuição normal. Os resultados foram examinados utilizando “two-way” ANOVA (touro x grupo). As medias foram comparadas pelo teste de Duncan. Os dados que não apresentaram distribuição normal foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis, utilizando as medianas pelo teste de comparação múltipla de Dunn e considerados significativas quando  $P < 0,05$ . O coeficiente de correlação de Spearman ( $r$ ) foi calculado para variáveis selecionadas (ZAR, 1999). A análise estatística foi realizada utilizando o SAS - Statistical Analysis System software (release 9.2. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2008).

## VII. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 7.1 Motilidade e Vigor

Os resultados obtidos nas avaliações físicas pela microscopia óptica da motilidade e vigor estão descritos na Tabela 2.

**TABELA 2.** Média e desvio padrão da motilidade (porcentagem) e do vigor (0 a 5) de touros jovens (n=27), adultos (n=52), senis (n=34) no sêmen pós-descongelamento, avaliados em microscopia de contraste de fase.

<b>Grupo</b>	<b>Motilidade%</b>	<b>Vigor</b>
<b>Jovens</b>	38,9±10,9 <sup>a</sup>	3,7±0,7
<b>Adultos</b>	38,2±8,8 <sup>a</sup>	3,6±0,6
<b>Senis</b>	33,7±6,1 <sup>b</sup>	3,5±0,4

<sup>a,b</sup>Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Duncan (P<0,05).

O grupo de animais jovens e adultos apresentou resultados significativamente superiores (P<0,05) em relação aos senis, quanto à motilidade espermática. No entanto, diferenças não foram observadas em relação ao vigor.

Trabalhos similares a estes relatam que valores superiores de motilidade em touros jovens e adultos, correspondem ao desenvolvimento testicular em decorrência do alcance da maturidade sexual (FRENEAU et al., 2006; FORTES et al., 2012).

Enquanto a redução da motilidade espermática em touros idosos estaria relacionada ao aumento da susceptibilidade a lesões degenerativas nos testículos (KUMI-DIAKA et al., 1981; BRITO et al., 2002) e diminuição da atividade antioxidante do plasma seminal (KELSO et al., 1997), reduzindo, portanto sua performance reprodutiva.

## 7.2 Concentração e Morfologia Espermática

Os valores referentes à concentração e morfologia espermática estão descritos na Tabela 3.

**TABELA 3.** Média e desvio padrão da concentração espermática ( $\times 10^6$ /palheta), da porcentagem de defeitos maiores, menores e totais dos touros jovens ( $n=27$ ), adultos ( $n=52$ ) e senis ( $n=34$ ), no sêmen pós-descongelamento, avaliados em microscopia de interferência diferencial (DIC, imersão em óleo, 1000x).

Grupo	Concentração	Defeitos Maiores	Defeitos Menores	Defeitos Totais
Jovens	28,6 $\pm$ 8,7 <sup>a</sup>	13,7 $\pm$ 5,0 <sup>a</sup>	5,1 $\pm$ 3,3 <sup>a</sup>	18,8 $\pm$ 7,0 <sup>a</sup>
Adultos	21,0 $\pm$ 3,3 <sup>c</sup>	9,3 $\pm$ 5,7 <sup>b</sup>	6,3 $\pm$ 3,9 <sup>a</sup>	14,5 $\pm$ 7,8 <sup>b</sup>
Senis	24,5 $\pm$ 4,7 <sup>b</sup>	9,2 $\pm$ 4,7 <sup>b</sup>	6,3 $\pm$ 5,0 <sup>a</sup>	15,1 $\pm$ 6,4 <sup>ab</sup>

<sup>a,b</sup> Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P<0,05$ ).

O grupo de touros jovens apresentou concentração espermática maior do que os animais adultos e senis. Quanto à porcentagem de defeitos maiores, os touros jovens apresentaram índices mais altos quando comparados aos demais ( $P<0,05$ ). Entretanto, a porcentagem de defeitos menores não diferiu entre os grupos estudados. Porém, quando as características morfológicas totais foram somadas (defeitos maiores e menores) os touros jovens mantiveram média superior de defeitos seguido de touros adultos ( $P<0,05$ ).

Estudos avaliando o índice de anormalidades referente à idade relatam que anormalidades espermáticas são comuns em animais jovens, principalmente durante a puberdade (SÖDERQUIST et al., 1996; TROÓNIZ et al., 1991; FRENEAU et al., 2006) e normalmente refletem espermiogênese não regularizada em decorrência da imaturidade sexual (AMANN et al., 2000).

Apesar dos valores de patologia espermática ser maior em touros jovens, estes ainda se encontram dentro dos limites aceitáveis para defeitos (< 30% de defeitos totais - FONSECA et al., 1992) caracterizando estes animais como sexualmente maduros.

Ahmad et al. (2011) relataram que a porcentagem de anormalidades é pouco influenciada pela idade, evidenciando apenas maior porcentagem de defeitos no grupo de touros com 3 e 8 anos de idade e que em seis dos oito grupos estudados

a porcentagem média de anormalidades foi de  $18 \pm 0,3\%$ , semelhante ao nosso estudo.

### 7.3 Integridade da Membrana Plasmática e Acrossoma

Quanto à avaliação simultânea das membranas plasmática e do acrossoma espermático, os dados foram classificados em quatro classes de resultados descritos na Tabela 4.

**TABELA 4.** Média e desvio padrão da porcentagem de espermatozoides, quanto à integridade da membrana plasmática e acrossoma, corados pela associação das sondas fluorescentes PI e FITC-PSA e avaliados pela citometria de fluxo em touros jovens (n=27), adultos (n=52) e senis (n=34), pós-descongelamento.

Grupo	MIAI	MIAL	MLAI	MLAL
Jovens	54,7±9,5 <sup>a</sup>	10,6±8,4 <sup>b</sup>	12,8±4,9 <sup>b</sup>	21,9±9,4
Adultos	46,7±10,1 <sup>b</sup>	14,5±10,4 <sup>b</sup>	15,1±5,4 <sup>ab</sup>	23,7±7,0
Senis	37,5±9,8 <sup>c</sup>	20,7±13,4 <sup>a</sup>	16,6±6,4 <sup>a</sup>	25,1±8,5

<sup>a,b</sup> Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Duncan (P<0,05).

MIAI: Membrana íntegra e acrossoma íntegro

MIAL: Membrana íntegra e acrossoma lesado

MLAI: Membrana lesada e acrossoma íntegro

MLAL: Membrana lesada e acrossoma lesado

A integridade da membrana plasmática é vital para a sobrevivência do espermatozoide para manutenção da homeostase, motilidade (HOSSAIN et al., 2011) e eventos associados à fertilização tais como a capacitação espermática, ligação à zona pelúcida, reação acrossomal e fusão dos gametas (PAPA et al., 2000). Assim, espermatozoides com membranas íntegras podem ser indicativo de maior eficiência de sobrevivência à tecnologia envolvida na criopreservação.

Em nosso estudo touros jovens possuíram maior porcentagem de espermatozoides com membrana íntegra e acrossoma íntegro (MIAI), seguido pelo grupo de animais adultos e senis (P<0,05).

Com relação aos parâmetros intermediários, membrana íntegra e acrossoma

lesado (MIAL), os touros jovens e adultos apresentaram os menores valores quando comparados aos senis, e quanto às membranas lesadas e acrossomas íntegros (MLAI) jovens obtiveram a menor média e os senis a maior ( $P < 0,05$ ), porém, o grupo de touros adultos não diferiu dos demais. Para a variável que avaliou a ocorrência simultânea dos piores parâmetros, ou seja, membrana lesada e acrossoma lesada (MLAL) os grupos não apresentaram diferença significativa ( $P > 0,05$ ).

Quando se agruparam os quatro parâmetros dos resultados obtidos na associação do PI com FITC-PSA de acordo com a integridade da membrana (MLAI+MLAL) e do acrossoma (MIAL+MLAL), os jovens apresentaram a menor média de espermatozoides com membrana lesada e os senis a maior, enquanto os touros adultos não diferiram dos demais. Quanto à integridade do acrossoma, espermatozoides de touros senis apresentaram a maior média de acrossoma lesados e os touros jovens a menor média, enquanto os adultos não diferiram dos demais ( $P < 0,05$ ; Tabela 5).

**TABELA 5.** Média e desvio padrão da porcentagem de espermatozoides com membrana lesada (MLAI+MLAL) e acrossoma lesado (MIAL+MLAL), obtidas pela soma dos resultados obtidos pela coloração simultânea com as sondas fluorescentes PI e FITC-PSA e avaliados pela citometria de fluxo em touros jovens ( $n=27$ ), adultos ( $n=52$ ) e senis ( $n=34$ ), no sêmen pós-descongelamento.

<b>Grupo</b>	<b>Membrana Lesada</b>	<b>Acrossoma Lesado</b>
<b>Jovens</b>	34,70±12,27 <sup>b</sup>	32,52±8,75 <sup>c</sup>
<b>Adultos</b>	38,81±9,76 <sup>ab</sup>	38,23±11,52 <sup>b</sup>
<b>Senis</b>	41,76±10,67 <sup>a</sup>	45,85±13,72 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ ).

A membrana plasmática dos espermatozoides aparentemente modifica-se com a idade, como demonstrado por Hallap et al. (2004) e (2006), que relataram aumento e melhora contínua da porcentagem de membrana íntegra em animais que haviam sido colhidos com 1 ano, 4 anos e posteriormente aos 7 anos de idade.

Ao contrário, Ahmad et al. (2011) quando avaliaram 89 touros de diferentes idades e verificaram que a integridade da membrana plasmática permanece quase

inalterada com o avançar da idade. No entanto, devemos ressaltar que o baixo número de amostras por grupos podem ter influenciado a ausência de correlação deste parâmetro com a idade.

A baixa qualidade da membrana plasmática em touros senis, quando comparado com os outros grupos, pode ser estar associada à redução do seu conteúdo lipídico durante o envelhecimento, já que espermatozóides de touros idosos apresentam redução significativa na concentração de fosfolípidos e colesterol livre (KELSO et al., 1997).

Sabe-se que baixa relação colesterol:fosfolípido reduz a capacidade de tolerância ao choque frio favorecendo danos na membrana plasmática durante a criopreservação (OLIVEIRA et al., 2010), como a fusão das membranas que pode levar capacitação e reação acrossomal prematura reduzindo assim a sobrevivência dos espermatozóides (HOSHI et al., 1990; YANAGIMACHI, 1994)

#### 7.4 Potencial Mitocondrial

Nossos resultados indicaram que espermatozóides de touros adultos e senis apresentaram índices de baixo potencial mitocondrial bem mais elevado do que os touros jovens ( $P < 0,05$ ) (Tabela corroborando com os resultados de Amaral e Ramalho-Santos (2009), que verificaram declínio da função mitocondrial de acordo com a vida reprodutiva, exibindo pico de funcionalidade quando jovens e reduzindo com o envelhecimento.

**TABELA 6.** Média e desvio padrão das porcentagens de espermatozoides corados com JC-1 e avaliados por citometria de fluxo quanto ao potencial mitocondrial (alto, médio e baixo) dos grupos de touros Jovens ( $n=27$ ), Adultos ( $n=52$ ) e Senis ( $n=34$ ), no sêmen pós-descongelamento.

Grupo	Alto Potencial	Médio Potencial	Baixo Potencial
Jovens	81,7±9,4 <sup>a</sup>	13,4±6,6 <sup>a</sup>	4,9±4,2 <sup>b</sup>
Adultos	67,8±10,4 <sup>b</sup>	7,8±4,6 <sup>b</sup>	24,4±12,6 <sup>a</sup>
Senis	65,3±12,1 <sup>b</sup>	5,6±3,6 <sup>b</sup>	29,1±13,8 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Médias seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ ).



Nossos resultados indicaram que espermatozoides de touros adultos e senis apresentaram índices de baixo potencial mitocondrial bem mais elevado do que os touros jovens ( $P < 0,05$ ) corroborando com os resultados de Amaral e Ramalho-Santos (2009), que verificaram declínio da função mitocondrial de acordo com a vida reprodutiva, exibindo pico de funcionalidade quando jovens e reduzindo com o envelhecimento.

O declínio progressivo do potencial mitocondrial representa uma alteração funcional. E esta associação da idade com a disfunção mitocondrial podem potencialmente levar ao colapso de energia repercutindo negativamente com a homeostase celular (AMARAL & RAMALHO-SANTOS, 2009) e desencadeando apoptose e conseqüentemente redução da viabilidade espermática (PEÑA et al., 2009).

### 7.5 Geração Intracelular de ROS – Ânion Superóxido

A geração de ROS não diferiu significativamente entre os grupos. Entretanto, houve tendência do aumento no grupo de touros jovens seguidos dos adultos e senis (Tabela 7).

**TABELA 7.** Média ( $\bar{x}$ ), desvio padrão ( $s$ ) e mediana ( $Md$ ) da porcentagem de espermatozoides viáveis gerando ânion de superóxido por meio da sonda fluorescente DHE, avaliados pela citometria de fluxo em touros Jovens ( $n=27$ ), Adultos ( $n=52$ ) e Senis ( $n=34$ ), no sêmen pós-descongelamento.

<b>Grupo</b>	<b>DHE%</b> $(\bar{x} \pm sd)$	<b>DHE%</b> <b>(Md)</b>
<b>Jovens</b>	57,6±10,7	56,40 <sup>a</sup>
<b>Adultos</b>	53,3±11,0	53,04 <sup>a</sup>
<b>Senis</b>	53,7±20,5	50,13 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Medianas seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si ( $P < 0,05$ ).

Algumas pesquisas constataram aumento da geração de ROS e redução da atividade antioxidante com o avanço da idade (KELSO et al., 1997, WEIR &

ROBAIERE, 2006; COCUZZA et al., 2008), diferindo dos nossos dados onde a geração espontânea de ânion superóxido no sêmen criopreservado não apresentou relação com a idade.

Entretanto, cabe ressaltar que existem diversas metodologias para avaliar a geração de ROS podendo gerar resultados diferentes. Weir e Robaiere (2006) e Cocuzza et al. (2008) mensuraram a geração de ROS no sêmen fresco por meio de ensaios fluorométricos e quimioluminescência. Já o presente estudo utilizou sêmen criopreservado e citometria de fluxo permitindo avaliar o nível intracelular de ROS por meio de sondas fluorescentes (DHE) capaz de detecta selecionando apenas espermatozoides viáveis, o que não é possível com a quimioluminescência (MAHFOUZ et al., 2009).

Embora a criopreservação tenha sido frequentemente associada com aumento da geração de ânion superóxido em bovinos e à redução da qualidade espermática (CHATERJEE & GAGNON, 2001). Recentes estudos contestam a hipótese de que o processo de criopreservação aumenta a formação de ROS e que seriam responsáveis pela deterioração da motilidade e viabilidade do sêmen congelado, pois argumentam que a geração intracelular de  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  mantém-se abaixo ou similar quando comparado ao sêmen fresco (KARDIVEL et al., 2009; AWADA et al., 2009; GUTHRIE & WELCH, 2012).

## 7.6 Peroxidação Lipídica

A avaliação da susceptibilidade à peroxidação lipídica pela adição de sulfato ferroso e ascorbato por meio da mensuração TBARS está expressa na Tabela 8.

**TABELA 8.** Média ( $\bar{x}$ ), desvio padrão ( $s$ ) e mediana ( $Md$ ) da susceptibilidade da célula espermática pós-descongelamento à peroxidação lipídica avaliados pela técnica do TBARS ( $\text{ng} \times 10^6$  espermatozoides) por espectrofotometria em touros Jovens ( $n=27$ ), Adultos ( $n=52$ ) e Senis ( $n=34$ ).

Grupo	TBARS ( $\text{ng} \times 10^6$ sptz) ( $\bar{x} \pm s$ )	TBARS ( $\text{ng} \times 10^6$ sptz) ( $Md$ )
Jovens	379,1 $\pm$ 512,5	191,53 <sup>b</sup>
Adultos	500,1 $\pm$ 464,6	341,83 <sup>a</sup>
Senis	291,0 $\pm$ 244,7	223,74 <sup>a, b</sup>

<sup>a,b</sup> Medianas seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si ( $P < 0,05$ ).

O estudo demonstrou que espermatozoides de touros jovens apresentam baixa concentração de TBARS em relação aos adultos ( $P < 0,05$ ), mas diferenças significativas não foram encontradas entre touros adultos versus senis e senis versus jovens ( $P > 0,05$ ).

Bálic et al. (2012) constataram que a concentração de TBARS não é influenciada pela idade, mas pela sazonalidade ao demonstrarem que processos oxidativos se intensificam no sêmen fresco de touros Simental jovens durante a primavera e verão e nos idosos durante o inverno.

Nichi et al. (2006), dosaram TBARS do plasma seminal em amostras de touros da raça Nelore e Simental, criados em clima tropical, durante o inverno e verão, e verificaram maior nível de estresse oxidativo em amostras colhidas no verão em relação ao inverno ( $728,1 \pm 462,5$  e  $423 \pm 410,6$ , respectivamente;  $p = 0,004$ ).

Outro estudo, ao avaliar o perfil oxidativo do sêmen criopreservado de touros *Bos taurus taurus* versus *Bos taurus indicus* não verificou diferença significativa da concentração de TBARS em relação a raça e durante os meses de verão e inverno ( $828,46 \pm 242,45$  e  $1106,48 \pm 216,15$ , respectivamente;  $p = 0,28$ ) (RODRIGUES, 2009).

A presente pesquisa não teve como objetivo avaliar o efeito da sazonalidade com a idade, mas é possível que fatores ambientais possam ter influenciado a concentração de TBARS, já que o sêmen de touros jovens foi colhido durante o inverno e o de adultos e senis no verão.

Além disso, sabe-se que a presença de frutose em soluções crioprotetoras pode interferir na concentração de TBARS no sêmen criopreservado, subestimando os resultados (RODRIGUES, 2009).

Em relação aos níveis de peroxidação lipídica espontânea, avaliado por meio da sonda fluorescente BodipyC<sub>11</sub><sup>581/591</sup>, reconhecida como método de alta repetibilidade e sensibilidade, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (Tabela 9).

**TABELA 9.** Média ( $\bar{x}$ ), desvio padrão ( $s$ ) e mediana ( $Md$ ) o padrão da porcentagem de espermatozoides viáveis apresentando peroxidação lipídica corados com BODIPYC<sub>11</sub><sup>581/591</sup> e avaliados pela citometria de fluxo em touros Jovens (n=27), Adultos (n=52) e Senis (n=34), no sêmen pós-descongelamento.

<b>Grupo</b>	<b>BODIPY%</b> <b>(<math>\bar{x} \pm s</math>)</b>	<b>BODIPY %</b> <b>(<math>Md</math>)</b>
<b>Jovens</b>	3,4±4,2 <sup>a</sup>	1,98 <sup>a</sup>
<b>Adultos</b>	3,3±3,1 <sup>a</sup>	2,24 <sup>a</sup>
<b>Senis</b>	3,1±1,9 <sup>a</sup>	2,61 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup>Medianas seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si (P<0,05).

A porcentagem de células peroxidadas no sêmen criopreservado de touros jovens, adultos e idosos mostrou-se baixa, menor que 2,61%.

Resultados semelhantes foram observados no sêmen descongelado de varrões e garanhões (FERRUZOLA et al., 2009; GUTHRIE & WELCH, 2012).

O sêmen fresco bovino é considerado resistente à peroxidação lipídica, pois apenas um número limitado de células exibe danos peroxidativos após incubação por 12 horas. Esta resistência também foi observada no sêmen descongelado devido ao efeito protetor do meio diluidor à base de gema de ovo que contém potentes antioxidantes (caroteno e vitamina E) (BROWERS & GADELLA, 2003).

Desta forma, a baixa porcentagem de peroxidação lipídica e ausência de diferenças significativas entre os grupos encontrados neste estudo, podem estar associadas ao efeito protetor do meio diluidor à base de gema de ovo.

### 5.7 Danos Oxidativos no DNA

Nossos dados mostram diferenças significativas de danos oxidativos no DNA conforme a idade. Espermatozoides de touros senis apresentaram alta porcentagem de células 8OHdG positivas quando comparados aos adultos seguido dos jovens (Tabela 10 e Figura1).

**TABELA 10.** Média ( $\bar{x}$ ), desvio padrão ( $s$ ) e mediana ( $Md$ ) da porcentagem de espermatozoides com alterações na cromatina causadas por danos oxidativos utilizando kit 8-OHdG e avaliados por citometria de fluxo para os grupos de touros Jovens ( $n=27$ ), Adultos ( $n=52$ ) e Senis ( $n=34$ ), no sêmen pós-descongelamento.

Grupo	8OHdG% ( $\bar{x} \pm s$ )	8OHdG% ( $Md$ )
Jovens	25,7±6,2	24,57 <sup>c</sup>
Adultos	34,9±9,2	35.60 <sup>b</sup>
Senis	44,1±11,0	45,58 <sup>a</sup>

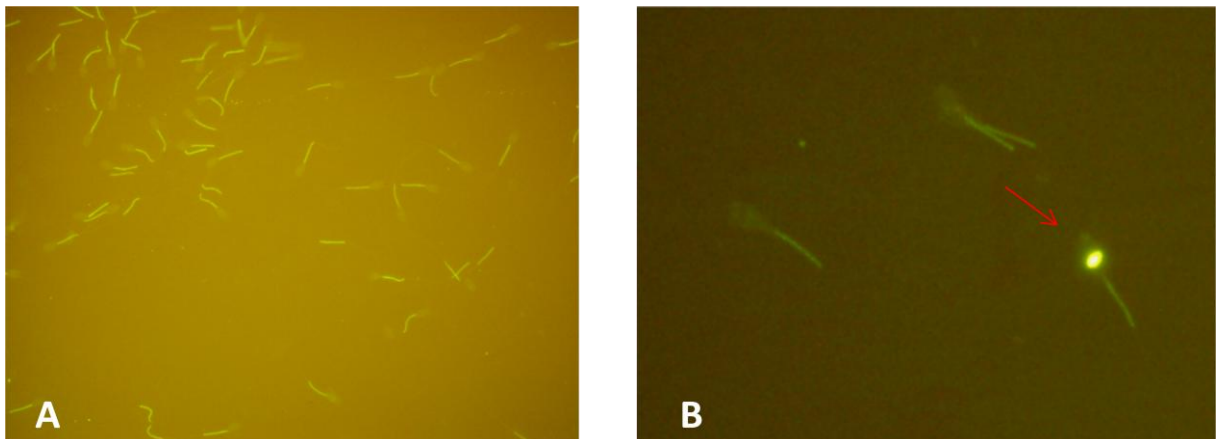
<sup>a,b</sup> Medianas seguidas de letras distintas na coluna diferem entre si ( $P<0,05$ ).

Animais senis apresentam o acúmulo de danos de DNA durante o envelhecimento devido à baixa capacidade de reparação das células germinativas. (PAUL et al., 2011).

Outro fator associado ao aumento da fragmentação de DNA relacionado à idade é a alteração do empacotamento da cromatina. A cromatina espermática de roedores idosos aparenta ser mais descondensada e consequentemente mais frágil proporcionando menor resistência ao estresse oxidativo quando comparado com animais jovens (ZUBKOVA et al., 2005).

Vale ressaltar que além da baixa capacidade de reparação das células germinativas (PAUL et al., 2011), o organismo sofre com a redução da atividade

antioxidante do trato reprodutivo durante a senilidade (WEIR & ROBAIRE, 2006; ZUBKOVA et al, 2004), predispondo ao acúmulo de danos oxidativos (ZUBKOVA et al, 2004). Em bovinos, tanto as consequências da criopreservação (BILODEAU et al., 2002), como o envelhecimento (KELSO et al., 1997), podem reduzir drasticamente o nível de antioxidantes no sêmen. No presente estudo tanto os efeitos da idade como da criopreservação, favoreceram os danos por oxidação.



**Figura 1** – Fotomicrografia de espermatozoides corados pelo *kit* 8OHdG. A) Espermatozoide sem dano oxidativo na cromatina (Olympus BX61, 200X). B) Espermatozoide com danos oxidativos na cromatina (seta) avaliado pela microscopia de fluorescência (Olympus BX61, 400X).

## 5.8 Correlações

Com o intuito de avaliar o efeito da idade sobre os parâmetros espermáticos foi realizado teste de correlação com algumas variáveis consideradas importantes para o processo de fertilização e também verificar se a geração de superóxido e danos oxidativos tanto na membrana plasmática e DNA aumentam com a idade (Tabela 11).

**TABELA 11.** Coeficiente de correlação e valor de P das variáveis alto e baixo potencial mitocondrial, membrana íntegra e acrossoma íntegro, membrana lesada, acrossoma lesado, ânion superóxido, peroxidação lipídica e danos no DNA em relação à idade no sêmen pós-descongelamento.

Variáveis	Correlação	P
Motilidade	-0,18	0,0557
Alto Potencial Mitocondrial	-0,35	0,0001
Baixo Potencial Mitocondrial	0,47	<0,0001
Membrana Íntegra e Acrossoma Íntegro	-0,38	<0,0001
Membrana Lesada	0,25	0,0091
Acrossoma Lesado	0,19	0,042
Geração de ROS - Anion de Superóxido	-0,09	0,3468
Peroxidação Lipídica – BodipyC <sub>11</sub> <sup>581/591</sup>	-0,03	0,7917
Peroxidação Lipídica - TBARS	-0,16	0,0894
Danos no DNA	0,63	<0,0001

Como podemos observar variáveis consideradas desejáveis, tais como, motilidade, alto potencial mitocondrial, membrana e acrossoma íntegros apresentaram correlação negativa com a idade. Enquanto parâmetros como baixo potencial mitocondrial, membrana lesada e acrossoma lesado obtiveram coeficiente de correlação positivo, indicando a redução da qualidade espermática com o avanço da idade.

Com relação ao nível de ânion superóxido e peroxidação lipídica nenhuma correlação foi observada com a idade. Diferente de pesquisa realizada no sêmen *in natura* de homens acima de 40 anos de idade onde houve aumento significativo de ROS (COCUZZA et al., 2008).

Esta diferença pode estar associada ao tipo de amostra utilizada, já que nossos resultados são referentes a amostras criopreservadas, diferente da maioria

das pesquisas que utilizam sêmen fresco (KELSO et al., 1997; WEIR & ROBAIRE, 2006; COCCUZZA et al., 2008). A ausência de correlação entre a idade e os níveis de peroxidação lipídica também pode ser justificada pela interferência do meio diluidor do sêmen congelado (GUTHIE & WELCH, 2012) impedindo identificar o nível real de danos peroxidativos.

No entanto, a pressuposição do aumento do estresse oxidativo com o avanço da idade no sêmen criopreservado foi confirmada pela correlação positiva entre a idade e danos no DNA através da formação 8 oxo-guanina corroborando como os resultados encontrados em roedores (PAUL et al. 2011; ZUBKOVA et al., 2005). Estes dados na espécie bovina podem trazer novas perspectivas sobre a influência da idade na fertilização *in vitro*, já que há estudos relatando que o uso de sêmen pré-tratado com agentes oxidantes interfere negativamente no desenvolvimento embrionário (HENDRICKS & HANSEN, 2010)

Com o intuito de avaliar a relação dos danos oxidativos com alguns parâmetros seminais, foi realizada a correlação entre a integridade da membrana e potencial mitocondrial com os biomarcadores do estresse oxidativo (Tabela 12).

**TABELA 12.** Coeficiente de correlação e valor de P das variáveis MIAI, MLAL e alto e baixo potencial mitocondrial, com a geração de ânion superóxido, peroxidação lipídica e danos no DNA no sêmen pós-descongelamento.

Variáveis	Ânion superóxido	Peroxidação Lipídica		Danos DNA
		BodipyC <sub>11</sub>	TBARS	
<b>Membrana Íntegra Acrossoma Íntegro</b>	0,18 (0,24)	-0,04 (0,78)	-0,19 (0,24)	-0,33* <b>(0,03)</b>
<b>Membrana Lesada Acrossoma Lesado</b>	0,05 (0,71)	-0,10 (0,52)	-0,003 (0,98)	0,03 (0,85)
<b>Alto potencial Mitocondrial</b>	0,01 (0,90)	-0,15 (0,32)	0,04 (0,79)	-0,26 (0,10)
<b>Baixo Potencial Mitocondrial</b>	-0,06 (0,68)	-0,24 (0,13)	-0,09 (0,55)	0,38* <b>(0,01)</b>

\*Diferenças significativas.

Nenhuma correlação foi observada entre a geração de ROS, peroxidação lipídica com as variáveis estudadas. Apesar de estes resultados diferirem da maioria (WEIR; ROBAIRE, 2006; COCCUZZA et al., 2008); Kardivel et al. (2009), também



não notaram nenhuma correlação entre a motilidade espermática, ROS e peroxidação lipídica no sêmen congelado e descongelado de búfalos.

A ausência de correlação da variável ânion superóxido com a integridade da membrana pode ser explicada pela característica química do ânion que impossibilita atravessar a membrana plasmática e induzir danos severos quando comparado a outros ROS, como, por exemplo, o peróxido de hidrogênio, altamente instável e capaz de gerar outros radicais livres como o radical hidroxila, considerados os mais deletérios (AITKEN & BENNETTS, 2006; BURNAUGH et al., 2007; MAIA & BICUDO, 2010).

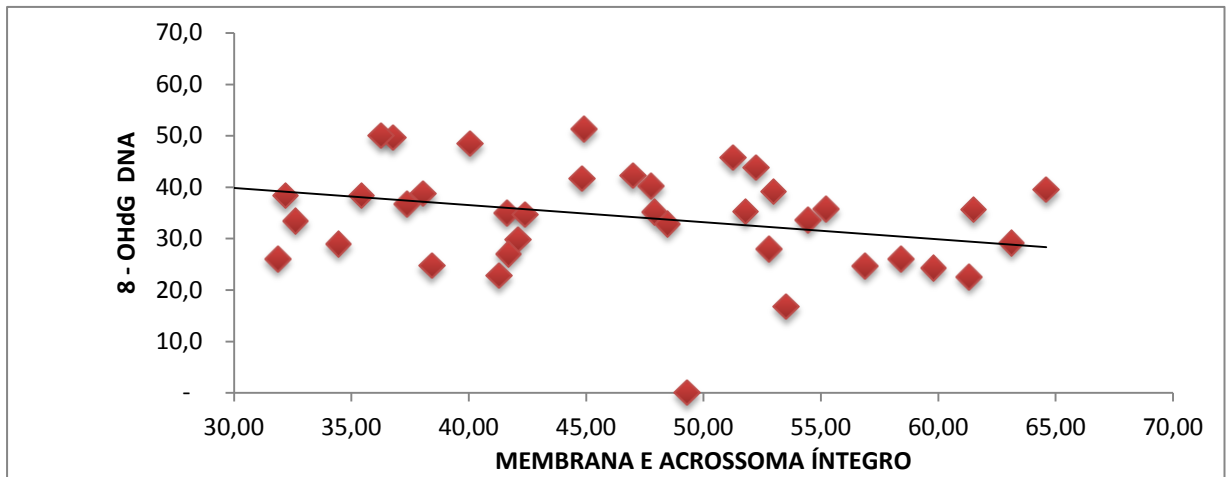
O ânion superóxido também não influenciou o potencial mitocondrial. Resultados semelhantes foram observados no sêmen equino e de varrões após oxidação artificial utilizando xantina-xantina-oxidase (GUTHRIE & WELCH, 2012; BAUMBER et al., 2000). A escassez de valores que indicam o nível fisiológico de ROS no sêmen criopreservado dificulta a comparação dos resultados com outras espécies, mas a porcentagem de células encontradas gerando superóxido pode não ter sido suficiente para alterar a integridade da membrana mitocondrial.

Diante dos baixos níveis de peroxidação lipídica e ausência de correlação entre a integridade da membrana e potencial mitocondrial, é provável que a peroxidação lipídica não foi a principal causa de danos na membrana plasmática de espermatozoides criopreservados. Como mencionado por Kardivel et al (2009), danos na membrana plasmática no sêmen criopreservado podem ser causados por outros fatores, como a formação de gelo intracelular e estresse osmótico e não apenas pela peroxidação lipídica (ALVAREZ & STOREY, 1993).

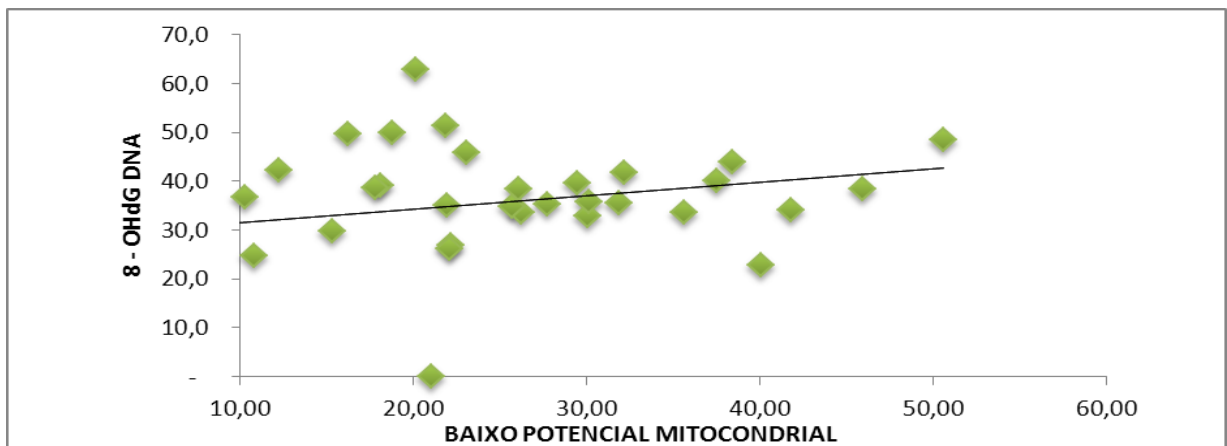
Além disso, várias correlações significativas entre ROS, potencial mitocondrial e peroxidação lipídica se referem a amostras de baixa qualidade caracterizada por baixa concentração espermática, baixa motilidade e alta porcentagem de espermatozoides imaturos (WANG et al., 2003; AITKEN et al., 2007). Diferente deste estudo que utilizou touros com fertilidade comprovada.

Entretanto, apesar da peroxidação lipídica não ser considerada o principal fator envolvido nos danos causados pela criopreservação, ela pode desencadear mecanismos indiretos como a apoptose levando a injúrias sub-letais nos espermatozoides sobreviventes (FERRUSOLA et al., 2009).

Já em relação aos danos no DNA, nosso estudo demonstrou correlação negativa com a variável membrana íntegra e correlação positiva com baixo potencial mitocondrial ( $R = -0,33$ ,  $P < 0,05$  e  $R = 0,38$ ,  $P < 0,01$ , respectivamente; Figura 2 e 3).



**FIGURA 2.** Representação gráfica da correlação entre danos de DNA avaliado pela formação da 8 -OhdG e membrana e acrossoma íntegros utilizando a associação das sondas PI e FITC -PSA.. Nota-se que houve correlação negativa entre essas duas variáveis ( $R = -0,33$ ;  $P < 0,03$ ).



**FIGURA 3.** Representação gráfica da correlação entre danos de DNA avaliado pela formação da 8 -OhdG e baixo potencial mitocondrial utilizando a sonda JC1. Nota - se que houve correlação positiva entre essas duas variáveis ( $R = 0,39$ ;  $P < 0,01$ ).

Estes dados corroboram com os estudos de De Iuliis et al. (2009) que sugerem a participação da mitocôndria como possível fonte do estresse oxidativo, pois distúrbios mitocondriais levariam à liberação de ROS desencadeando início da cascata de apoptose, ativação de endonucleases e por fim a fragmentação do DNA espermático.

De acordo com nossos resultados pudemos constatar que a qualidade do sêmen criopreservado em bovinos declina com o avanço da idade e está associado à susceptibilidade ao estresse oxidativo, principalmente por lesões tipo 8-oxyguanina no DNA espermático.

## VIII. CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos, dentro das condições de realização deste experimento, conclui-se que:

- Touros jovens apresentaram melhor qualidade espermática pós-descongelamento e maior resistência ao estresse oxidativo quando comparados aos demais grupos.

- A geração espontânea de ânion superóxido não influencia a qualidade espermática do sêmen criopreservado de touros de diferentes idades.

- O sêmen criopreservado apresenta poucas células com danos peroxidativos quando avaliado pela sonda BodipyC<sub>11</sub><sup>581/591</sup>, provavelmente em consequência do efeito protetor do meio diluidor à base de gema de ovo.

- Touros idosos apresentaram motilidade reduzida, assim como, menor integridade da membrana plasmática, acrossomal, potencial mitocondrial e alta porcentagem de danos oxidativos no DNA.

- A redução da qualidade espermática em touros idosos foi associada como o avanço da idade e à susceptibilidade ao estresse oxidativo, pela alta porcentagem de danos oxidativos no DNA e sua relação com integridade da membrana e potencial mitocondrial

- Outras ROS podem estar envolvidas na redução da qualidade espermática e susceptibilidade ao estresse oxidativo durante o envelhecimento.

- O kit 8oxyDNA mostrou-se biomarcador eficiente para avaliação do estresse oxidativo no sêmen criopreservado quando comparado ao TBARS e BodipyC<sub>11</sub><sup>581/591</sup>.

## IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ, J. K.; STOREY, B. T. Evidence that membrane stress contributes more than lipid peroxidation to sublethal cryodamage in cryopreserved human sperm: glycerol and other polyols as sole cryoprotectant. **Journal of Andrology**. v. 14, p. 199-209, 1993.

AGARWAL, A.; ALLAMANESI, S. S.; SAID, T. M. Chemiluminescence technique for measuring reactive oxygen species. **Reproduction Biomedicine Online**. V. 9; p. 466-468, 2004.

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.

AHMAD, E.; AHMAD, N.; NASEER, Z. A. L.; EEM, M.; KHAN, M. S.; ASHIQ, M.; YOUNIS, M. Relationship of age to body weight, scrotal circumference, testicular ultrasonograms, and semen quality in Sahiwal bulls. **Tropical Animal Health Production**. v. 43, 159-164, 2011.

AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S.; FISHEL, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. **Biology of Reproduction**. v. 41, p. 183-197, 1987.

AITKEN, J.; BENNETTS, L. Reactive oxygen species: friend or foe. In: The sperm cell: production, maturation, fertilization and regeneration. ed. 1. **Cambridge University Press**, p. 170-194, 2006.

AITKEN, R. J.; WINGATE, K. J.; DE IULLIS, N. G.; McLAUGHLIN, A. E. Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11. **Molecular Human Reproduction**. v. 13, p.203-207, 2007.

AITKEN, R. J.; DE IULLIS, G. N. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, p. 3–13, 2010.

AITKEN, R. J.; JONES, K. T.; ROBERTSON, S. A. Reactive oxigens species and sperm function – in sickness and in health. **Journal of Andrology**. v. 33, p. 1096-1106, 2012.

AMANN, R.P.; SEIDEL, G.E.; MORTIMER, R.G. Fertilizing potential in vitro of semen from young beef bulls containing a high or low percentage of sperm with a proximal droplet. **Theriogenology**. v. 54, p. 1499-1515, 2000.

AMARAL, S.; RAMALHO-SANTOS, J. Aging, mitochondria and male reproductive function. **Current Aging Science**. v. 2, p. 165-173, 2009.

ANGELOPOULOU, R.; LAVRANOS, G.; MANOLAKOU, P. Ros in the aging male: Model diseases with ROS- related pathophysiology. **Reproductive Toxicology**. v. 28, p. 167-171, 2009.

ARMSTRONG, J. S.; RAJASEKARAN, M.; CHAMULITRAT, W.; GATTI, P.; HELLSTRON, W. J.; SIKKA, S. C. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. **Free Radical & Biological Medicine**. v. 26, p. 869-880, 1999.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C. Validação de uma técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides bovinos. **Acta Scientiae Veterinaria**, v.31, p.230-231, 2003.

AWADA, B. J.; MACKENZIE-BELL, M.; BUHR, M. M. R. Reactive oxygen species and boar sperm function. **Biology of Reproduction**. v. 81, p. 553-561, 2009.

BALIC, I. M.; MILINKOVIC-TUR, S.; SAMARDZIJA, M.; VINCE, S. Effect of age and environmental factors on semen quality glutathione peroxidase activity and oxidative parameters in Simmental bulls. **Theriogenology**. 2012.

BANSAL, B.; BILASPURI, G.S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. **Veterinary Medicine International**. p. 1-7, 2011.

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

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

BLOM, E. Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinaer Medicin**. v.25, p.383-391, 1973.

BREWIS, I. A.; MORTON, I. E.; MOHAMMAD, S. N.; BROWES, C. E.; MOORE, H. D. M. Measurement of Intracellular Calcium Concentration and Plasma Membrane Potential in Human Spermatozoa Using Flow Cytometry. **Journal of Andrology**. v. 21, p.238-249, 2000.

BRITO, C. F. L.; SILVA, F. D. E. A.; RODRIGUES, H. L.; VIEIRA, V. F.; DERAGON, G. A. L.; KASTELIC, P. J. Effect of age and genetic group on characteristics of the scrotum, tests and testicular vascular cones, and on sperm production and semen quality in AI bulls in Brazil. **Theriogenology**. v.58, p. 1175-1186, 2002.

BROWERS, M.H.F.J.; GADELLA, M.B. In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 35, p. 1382-1391, 2003.

BUCAK, M.N.; TUNCER, P.B.; SARIOZKAN, S.; BASPINAR, N.; TASPINAR, M.; ÇOAN, K.; BILGILI, A.; AKALIN, P.O.; BUYULEBLEBICI, S.; AYODS, S; ILGAZ, S.; SUNGURUGLU, O. Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: Antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. **Cryobiology**. 2010.

BUEGE, J. A.; AUSTIN, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzimology**. v. 52, n.4, p. 302-310, 1978.

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

CASEY, P. J.; HILLMAN, R.B.; ROBERTSON, K. R.; YUDIN, A. I.; LIU, I. K. M.; DROBNIS, E. Z. Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. **Journal of Andrology**. v.14, p. 289-297, 1993.

CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, J.;RAPHAEL, C. F.; ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R.P. Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**. v.62, n.3, p.536-543, 2010.

CENTOLA, G. M.; EBERLY, S. Seasonal variations and age-related changes in human sperm count, motility, motion parameters, morphology, and White blood cell concentration. **Fertility and Sterility**. v. 72, p. 803-808, 1999.

CHARTEJEE, S.; LAMIRANDE, D. E.; GAGNON, C. Cryopreservation Alters Membrane Sulfhydryl Status of Bull Spermatozoa: Protection by Oxidized Glutathione. **Molecular Reproduction and Development**. v.60, p.498-506, 2001.

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

CHEN, Z.; TOTH, T.; GODFREY-BAILEY, L.; MERCEDAT, N.; SCHIFF, I.; HAUSER, R. Seasonal Variation and Age-Related Changes in Human Semen Parameters. **Journal of Andrology**. v. 24, p. 226-231, 2003.

COCCUZA, M.; ATHAYDE, S.K.; AGARWAL, A.; SHARMA, R.; PAGANI, R.; LUCON, M.A.; SROUGI, M.; HALLAK, J. Age-related increase of reactive oxygen species in neat semen in healthy fertile men. **Journal Urology**. v. 71, p. 490-494, 2008.

COMHAIRE, F.H.; CHRISTOPHE, A.B.; ZAIATA, A.A. The effects of combined conventional treatment, oral antioxidants and essential fatty acids on sperm biology in subfertile men. **Prostaglandins Leukocytes and Essential Fatty Acids**. v. 63, p.159–165, 2000.

COSSARIZZA, A.; BACCARANI-CONTRI, M.; KALASHNIKOVA, G.; FRANCESCHI, C. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). **Biochemistry Biophysic Research Communications**. v.197, p.40-45, 1993.

CUI, J.; HOLMES, E.H.; GREENE, T.G.; LIU, F.K. Oxidative DNA damage precedes DNA fragmentation after experimental stroke in rat brain. **The FASEB Journal**. v. 7, p. 955-967, 2000.

DESAI, N.; SABANEKH, Jr. E.; KIM, T.; ARGARWAL, A. Free radical theory of aging: implications in male infertility. **Journal Urology**. p. 1-6, 2009.

DE IULIIS, G.N.; WINGATE, K.J.; KOPPERS, J.A.; McLAUGHLIN, E.A.; AITKEN, J. Definitive evidence for the nonmitochondrial production of superoxide anion by human spermatozoa. **The Journal of Endocrinology and Metabolism**. v. 91, p. 1968-1975, 2006.

DeIULIIS, G.N.; THOMSON, L.K.; MITCHELL, L.A.; FINNIE, J.M.; KOPPERS, A.J.; HEDGES, A.; NIXON, B.; AITKEN, R.J. DNA Damage in Human Spermatozoa Is Highly Correlated with the Efficiency of Chromatin Remodeling and the Formation of 8-Hydroxy-20-Deoxyguanosine, a Marker of Oxidative Stress. **Biology of Reproduction**. v.81, p.517–524, 2009.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa: I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. **Journal of Andrology**. v. 13, p. 368-378, 1992.

DE LAMIRANDE, E.; O'FLAHERTY, C. Sperm activation: Role of reactive oxygen species and kinases. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1784, p. 106-115, 2008.

DRUMMEN, G. P.; van LIEBERGEN, L.C.; OP den KAMO, J. A.; POST, J.A. C11 – BODIPY (581/591), a oxidation-sensitive fluorescent lipid peroxidation probe: (micro) spectroscopic characterization and validation of methodology. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 33, p. 473-490, 2002.

DURU, N. K.; MORSHEDI, M.; OEHNINGER, S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. **Fertility and Sterility**. v. 74, p. 1200-1207, 2000.

ESKENAZI, B.; WYROBEK, A.J.; SLOTER, E.; KIDD, S.A.; MOORE, L.; YOUNG, S.; MOORE, D. The association of age and semen quality in healthy men. **Human Reproduction**, v.18, p. 447-454, 2003.



EVENSON, D.P.; LARSON, K.L.; JOST, L.K. Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. **Journal of Andrology**, v. 23, p. 25-43, 2002

FERRUSOLA, O. G.; FERNÁNDEZ, L.G.; MORRELL, J.M.; SANDOVAL, S.C.; GARCIA, M.B.; MARTINEZ, R.H.; TAPIA, A.J.; PEÑA, J.F. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. **Reproduction and Fertility**. v.138, p. 55-63, 2009.

FONSECA, V.O.; VALE FILHO, V.R.; MIES FILHO, A.; ABREU, J.J. **Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Belo Horizonte - MG.1992. 79p.

FORTES, M.R.S.; HOLROYD, R.G.; REVERTER, A.; VENUS, B.K.; SATAKE, N.; BOE-HANSEN, G.B. The integrity of sperm chromatin in young tropical composite bulls. **Theriogenology**. v. 78, 326-333, 2012.

FRENEAU, G.E.; VALE FILHO, V.R.; MARIA, W.S. Puberdade em touros Nelore criados em pasto no Brasil: características corporais, testiculares e seminais e de índice de capacidade andrológica por pontos. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 58, p. 1107-1115, 2006.

GARCÍA-FERREYRA, J.; ROMERO R.; HILARIO R.; DUEÑAS-CHACÓN. High levels of DNA fragmentation observed in an infertile population attending a fertility Center are related to advanced paternal age. **Journal Fertility in Vitro**. V. 2, p. 1-5, 2012.

GARCÍA-MACÍAS, V.; PAZ, P.; MARTINEZ-PASTOR, F.; ALVAREZ, M.; GOMES-ALVES, S.; BERNARDO, J.; ANEL, E.; ANEL, L. DNA fragmentation assessment by flow cytometry and Sperm-Bos-Halomax (bright-field microscopy and fluorescence microscopy) in bull semen. **International Journal of Andrology**. v. 30, p. 88-98, 2006.

GEORGE, S.K.; JIAO, Y.; BISHOP, CE; LU, B.; Oxidative stress is involved in age-dependent spermatogenic damage of Imp21 mutant mice. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 52, p. 2223-2233, 2012.

GONÇALVES, S.F.; BARRETTO, S.S.L.; ARRUDA, P.R.; MINGOTI, Z.G. Effect of antioxidants during bovine in vitro fertilization procedures on spermatozoa and embryo development. **Reproduction Domestic Animals**. v. 45, p.129-135, 2010.

GRAVANCE, C.V.; GARNER, D.L.; BAUMBER, J.; BALL, B.A. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. **Theriogenology**. v. 53, p. 1691-1703, 2000.

GUTHRIE, H.D.; WELCH, G.R. Effects of reactive oxygen species on sperm function. **Theriogenology**. v. 78, p. 1700-1708, 2012.

HALLAP, T.; HAARD, M.; JAAKMA, Ü.; LARSSON, B.; MARTINEZ, R. H. Variations in quality of frozen-thawed semen from Swedish red and White AI sires at 1 and 4 years of age. **International Journal of Andrology**, v. 25, p. 166-171, 2004.

HALLAP, T.; JAAKMA, U.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Changes in semen quality in Estonian Holstein IA bulls at 3, 5 and 7 years of age. **Reproduction Domestic Animals**. v. 41, p. 214-218, 2006.

HALLIWELL, B.; CHIRICO, S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. **American Journal Clinical Nutrition**. v. 57, p. 715-725, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radical in biology and medicine**. 3 ed. New York:Oxford. University Press, p. 936, 1999.

HENDRICKS, K.; HANSEN, J.P. Consequences for the bovine embryo of being derived from a spermatozoon subjected to oxidative stress. **Australian Veterinary Journal**. V. 88, p. 307-310, 2010.

HOSHI, K.; AITA, T.; YANAGIDA, K.; YOSHIMATUS N.; SATO A. Variation in the cholesterol/phospholipid ratio in human spermatozoa and its relation with capacitation. **Human Reproduction**. v. 5, p. 71-74, 1990.

HOSSAIN, M.S.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN M.; NAGY, S.; SIQUEIRA, P.A.; RODRIGUWZ-MARTINEZ, H. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. **Asian Journal of Andrology**. v. 13, p. 409-419, 2011.

KADIRVEL, G.; KUMAR, S.; KUMARESAN, A. Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential and DNA integrity of spermatozoa in relation to intracellular reactive oxygen species in liquid and frozen-thawed buffalo semen. **Animal Reproduction Science**. v. 114, p. 125-134, 2009.

KELSO, K.A.; REDPATH, A.; NOBLE, R.C.; SPEAKE, B.K. Lipid and antioxidant changes in spermatozoa and seminal plasma throughout the reprodseuctive period of bulls. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.109, p. 1-6, 1997.

KIDD, A. S.; ESKENAZI, B.; WYROBEK, J. Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature. **Fertility and Sterility**. v. 75, n. 2, p. 237-248, 2001.

KOBAYASHI, H.; GIL-GUZMAN, E.; MAHRAN, A. M.; SHARMA, R.; NELSON, D. R.; THOMAS, A. J. Jr. Quality control of reactive oxygen species measurement by luminol-dependent chemiluminescence assay. **Journal Andrology**. v. 22, p. 455-465, 2001.

KOIVISTO, M.B.; COSTA, M.T.A.; PERRI, S.H.V.; VICENTE, W.R.R. The effect of season on semen characteristics and freezability in *Bos indicus* and *Bos Taurus* in the southeastern region of Brazil. **Reproduction in Domestic Animals**. v.44, p. 587-592, 2009.

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

KUMI-DIAKA, J.; NAGARATNAM, V; RWUAAN J. Seasonal and age-related changes in semen quality and testicular morphology of bulls in a tropical environment. **Veterinary Record**, v.3, p. 13-15, 1981.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 37, p. 293-303, 2001.

MAHFOUZ, R.; SHARMA, R.; LACKNER, J.; AZIZ, N.; AGARWAL, A. Evaluation of chemiluminescence and flow cytometry as tool in assessing production of hydrogen peroxide and superoxide anion in human spermatozoa. **Fertility and Sterility**. v. 92, p. 819-827, 2009.

MAIA, M.S.; BICUDO, S.D.; SICHERLE, C.C.; RODELLO, L.; GALLEGRO, I.C.S. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 122, p. 118-123, 2010.

MARTIN, I.; GROTEWIEL, S. Oxidative damage and age-related functional declines. **Mechanisms of Ageing and Development**. v. 127, p. 411-423, 2006.

MARY, J.; VOUGIER, S. P.; PERICHON, C. R.; PETROPOULOS, M.; FRIGUET, B. Enzymatic reactions involved in the repairs of oxidized protein. **Experimental Gerontology**. v. 39, p. 1117-1123, 2004.

McCARTHY, M. J.; BAUMBER, J.; KASS, P. H.; MEYERS, S. A. Osmotic stress induces oxidative cell damage to Rhesus Macaque spermatozoa. **Biology of Reproduction**. 2009.

MITCHELL, L.A.; DeIULIIS, G.N.; AITKEN, R.J. The TUNEL assay consistently underestimates DNA damage in human spermatozoa and is influenced by DNA compactation and cell vitality: development of an improved methodology. **International Journal of Andrology**, v. 33, p. 1-12, 2010.

NAIR, J.S.; BRAR, S.A.; AHUJA, S.C.; SANGHA, S.P.S.; CHAUDHARY, C.K.A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability

of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. **Animal Reproduction Science**. v. 96, p. 21-29, 2006.

NI, Z.; LIU, Y.; SHEN, H.; CHIA, S.E.; ONG, C.N. Does the increase of 8-hydroxydeoxyguanosine lead to poor sperm quality. **Mutation Research**, v.381, p.77-82, 1997.

NICHI, M.; BOLS, P.E.J.; ZUGE, R.M.; BARNABE, V.H.; GOOVAERTS I.G.F.; BARNABE, R.C.; CORTADA, C.N.M. **Theriogenology**. v. 66, p. 822-828, 2006.

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

OGBUEWU, L.P.; ALADI, N.O.; ETUK, I.F.; OPARA, M.N.; UCHEGOBU, M.C.; OKOLI, I.C.; ILOEJE, M.U. Relevance of oxygen free radicals and antioxidants in sperm production and function. **Research Journal of Veterinary Sciences**. p. 1-27, 2010.

OLIVEIRA, J.D.G. **Maximização do uso de touros a campo**. Anais do I Simpósio de Produção de Gado de Corte, Uberaba, Minas Gerais, Brasil, p.279-296, 1999.

PAP, E.H.W.; DRUMMEN, G.P.C.; WINTER, V.J.; KOOIJ, T.W.A.; RIJKEN, P.; WIRTZ, K. W. A; den KAMP, J. A. F. Op; POST, J. A. Ratio-fluorescence microscopy of lipid oxidation in living cells using C11-Bodipy<sup>581/591</sup>. **Federation of European Biochemical Societies**. v. 453, p. 278-282, 1999.

PAPA, F.O.; GABALDI, S.H.; WOLF, A. Viabilidade espermática pós-descongelamento de sêmen bovino criopreservados com meio diluente glicina-gema em quatro diferentes tempos de estabilização. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 24, p. 39-44, 2000.

PAUL, C.; NAGANO, M.; ROBAIRE, B. Aging results in differential regulation of DNA repair pathways in pachytene spermatocytes in the Brown Norway Rat. **Biology of Reproduction**. v. 85, p. 1269-1278, 2011.

PEÑA, F..J.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; TAPIA, J.A.; FERRUSOLA, O.C.; FERNÁNDEZ, L.G.; GARCÍA, B.M. Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review. **Reproduction Domestic Animal**. v. 44, p. 345-349, 2009.

REBOLLEDO, D.E.Á.; PASTOR, M.F.; SANTOS, F.R.M.; OLMO, del. E.; BISPAL, A.; SANTAELLA, R.L.J. Comparison of the TBARS assay and BODIPY C11 probes for assessing lipid peroxidation in red deer spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 45, p. 360-386, 2010.

RODRIGUES, M.P. **Perfil oxidativo e avaliação funcional do sêmen criopreservado de touros (*Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*) criados em**

**clima tropical.** Tese de mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo , Brasil, 2009, 103p.

RODRIGUEZ, P.C.; VALDEZ, B. L.; ZAOBORORNYJ, T.; BOVERIS, A.; BECONI, M. T. Nitric oxide and superoxide anion production during heparin-induced capacitation in cryopreserved Bovine spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals.** v. 46; p. 74-81, 2011.

SAKKAS, D.; ALVAREZ, J.G. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. **Fertility and Sterility** padronizar *article in press*, 2010.

SHEN, H.M.; CHIA, S.E.; ONG, C.N. Evaluation of oxidative DNA damage in human sperm and its association with male infertility. **Journal of Andrology.** v.20, p.718–723, 1999.

SILVA, P.F.N. **Physiology of peroxidation processes in mammalian sperm.** PhD Thesis, Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine. Utrecht, Holanda, 2006, 186p.

SILVA, F. M.; MARQUES, A.; CHAVEIRO, A. Reactive oxygen species: a Double-edged sword in reproduction. **The Open Veterinary Science Journal.** v. 4, p. 127-133, 2010.

SILVA, F.M.; CHAVEIRO, A.M.A. Reactive oxygen species: a Double-edge sword in reproduction. **The Open Veterinary Science Journal.** v.4, p. 127-1333, 2010.

SODERQUIST, L.; JANSON, L.; HAARD, M.; EINARSSON, S. Influence of season, age, breed and some other factors on the variation in sperm morphological abnormalities in Swedish dairy A.I bulls. **Animal Reproduction Science.** v. 33, p. 91-98, 1996.

SOHAL, R. S.; WEINDRUCH, R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. **Science.** v. 273, p. 59-63, p 1996.

SUBRAMANI, E.; CHAUDHURY, K. Detrimental effects of oxidative stress on sperm membrane and DNA integrity in normozoospermic infertility in normozoospermic infertile men. **Proceedings of 2010 International Conference on Systems in Medicine and Biology.** p. 198-202, 2010

THOUAS, G.A; TROUNSON, A.O.; JONES, G.M. Effect of female age on mouse oocyte developmental competence thawing mitochondrial injury. **Biology of Reproduction.** v. 73, p. 266-373, 2005.

THUWANUT, P.; AXNÉR, E.; JOHANISSON, A.; CHATDARONG, K. Detection of lipid peroxidation reaction in frozen-thawed epididymal cat spermatozoa using BODIPY<sup>581/591</sup>C11. **Reproduction in Domestic Animals,** v. 44, p. 373-376, 2009.

TROCÓNIZ, J.F.; BELTRÁN, J.; BASTIDAS, H.; LARREAL, H.; BASTIDAS, P. Testicular development, body weight changes, puberty and semen traits of growing Guzerat and Nelore bulls. **Theriogenology**. v. 35, p. 815-826, 1991.

VENKATESH, S.; DEECARAMAN, M.; KUMAR, R.; SHAMSI, M. B.; DADA, R. Role of reactive oxygen species in the pathogenesis of mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in male infertility. **Indian Journal Medicine Research**. v. 129, p. 127-137, 2009.

WANG, X.; SHARMA, R. K.; GUPTA, A.; GEORGE, V.; THOMAS A. J.; FALCONE, T.; AGARWAL, A. Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. **Fertility and Sterility**. v. 80, p. 844-850, 2003.

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

WEIR, P.C.; ROBAIRE, B. Spermatozoa have decreased antioxidant enzymatic capacity and increased reactive oxygen species production during aging in the Brown Norway Rat. **Journal of Andrology**. v.28, p. 229-240, 2006.

YANAGIMACHI R. Mammalian fertilization. In Knobil E, Neill, J (Ed.): **The physiology of reproduction**. 2ed. New York: Raven Press, p. 189-317, 1994.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. 4. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1999. 930p.

ZUBKOVA, E.V.; WADE, M.; ROBAIRE, M. Changes in spermatozoal chromatin packaging and susceptibility to oxidative challenge during aging. **Fertility and Sterility**. v. 84, p. 1191-1198, 2005.

ZUBKOVA, E; ROBAIRE, B. Effects of ageing on spermatozoal chromatin and its sensitivity to in vivo and in vitro oxidative challenge in the Brown Norway rat. **Human Reproduction**. v. 21, p. 2901-2910, 2006.