

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**N-ACETILCISTEÍNA E TROLOX NA CONSERVAÇÃO DE
CÉLULAS ESPERMÁTICAS EPIDIDIMÁRIAS DE CÃES**

**Paula Andressa Pennacchi Savi
Médica Veterinária**

2016

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**N-ACETILCISTEÍNA E TROLOX NA CONSERVAÇÃO DE
CÉLULAS ESPERMÁTICAS EPIDIDIMÁRIAS DE CÃES**

Paula Andressa Pennacchi Savi

Orientador: Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente

Coorientadoras: Dr^a. Eliandra Antônia Pires Büttler

Dr^a. Juliana Corrêa Borges

Dr^a. Maria Emília Franco Oliveira

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Reprodução Animal).

2016

S267n Savi, Paula Andressa Pennacchi
N-acetilcisteína e Trolox na conservação de células espermáticas
epididimárias de cães / Paula Andressa Pennacchi Savi. – –
Jaboticabal, 2016
xix, 83 p. : il. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

Orientador: Wilter Ricardo Russiano Vicente

Banca examinadora: Tathiana Ferguson Motheo, Fabiana
Azevedo Voorwald, Giuliano Queiroz Mostachio, Vera Fernanda
Martins Hossepian de Lima

Bibliografia

1. Criopreservação. 2. Canídeos. 3. Espécie reativa de oxigênio.
4. Antioxidantes. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.6:636.7

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: N-ACETILCISTEÍNA E TROLOX NA CONSERVAÇÃO DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS
EPIDIDIMÁRIAS DE CÃES

AUTORA: PAULA ANDRESSA PENNACCHI SAVI

ORIENTADOR: WILTER RICARDO RUSSIANO VICENTE

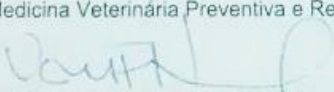
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA
VETERINÁRIA, área: REPRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:
COORIENTADORA: JULIANA CORREA BORGES SILVA
COORIENTADORA: ELIANDRA ANTONIA PIRES BUTTLER
COORIENTADORA: MARIA EMÍLIA FRANCO OLIVEIRA


Prof. Dr. WILTER RICARDO RUSSIANO VICENTE
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. GIULIANO QUEIROZ MOSTACHIO
UNIRP / Centro Universitário de Rio Preto - São José do Rio Preto/SP


Profa. Dra. FABIANA AZEVEDO VOORWALD
UNIRP / Centro Universitário de Rio Preto - São José do Rio Preto/SP


Pós-doutoranda TATHIANA FERGUSON MOTHEO
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. VERA FERNANDA MARTINS HOSSEPIAN DE LIMA
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 11 de fevereiro de 2016.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

PAULA ANDRESSA PENNACCHI SAVI - nascida em 16 de julho de 1986, em Londrina - PR. Médica Veterinária formada pela Universidade Estadual de Londrina – PR, em dezembro de 2008. Especialista Homeopata, formada em dezembro de 2010, pelo Curso de Especialização de Homeopatia de Londrina (CEHL). Mestre em Cirurgia Veterinária, no ano de 2012, pela Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho” *campus* Jaboticabal. Em março de 2012 ingressou no Doutorado pelo Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Reprodução Animal na Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho” *campus* Jaboticabal.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1. INTRODUÇÃO.....	9
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	10
2.1. Epidídimo.....	10
2.2. Técnicas de recuperação dos espermatozoides do epidídimo.....	11
2.3. Avaliação espermática.....	12
2.4. Função do plasma seminal.....	13
2.5 Análise espermática.....	13
2.6. Métodos de Criopreservação Espermática.....	15
2.7. Meio diluidor.....	16
2.8. Estresse oxidativo e Espécies Reativas de Oxigênio.....	17
2.9. ROS e função espermática.....	19
2.10. Antioxidantes.....	20
2.10.1. Trolox e Vitamina E.....	21
2.10.2. N-acetilcisteína (NAC).....	22
3.Hipótese.....	23
4. OBJETIVOS.....	23
4.1. Objetivo Geral.....	23
4.2. Objetivos Específicos.....	23
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
5.1. Animais.....	24
5.2. Obtenção do recuperado espermático.....	24
5.3. Unidades experimentais.....	25
5.4. Grupos Experimentais.....	26
5.5. Refrigeração e congelação.....	27
5.6 Meio Diluidor.....	27

5.7. Avaliação espermática.....	28
5.7.1. Concentração espermática.....	28
5.7.2. Morfologia espermática.....	28
5.7.3. Motilidade progressiva e vigor espermáticos.....	29
5.7.4. Teste Hiposmótico.....	29
5.7.5. Teste Supra Vital.....	30
5.7.6. Teste de Fluorescência.....	31
5.7.7. Teste de Atividade Citoquímica (Coloração DAB).....	32
5.8. Espécies Reativas de Oxigênio.....	34
5.8.1. Lipoperoxidação – Radical Hidroxila (OH [•]).....	34
5.8.2. Total de Espécies Reativas de Oxigênio.....	34
5.9. Análise Estatística.....	35
6. RESULTADOS.....	36
6.1. Avaliação espermática.....	36
6.1.1. Motilidade e vigor.....	36
6.1.2. Avaliação da integridade da membrana.....	39
6.1.3. Teste Vital.....	43
6.1.4. Lipoperoxidação – Mensuração da produção do radical OH [•]	45
6.1.5. Mensuração Total das ROS – TAC.....	46
6.1.6. Índice de Atividade Citoquímica – DAB.....	48
6.2. Correlação entre as análises espermáticas.....	49
6.3. Avaliação da Produção de ROS do fluido epididimário.....	50
6.4. Correlação entre a mensuração de ROS no fluido epididimário e as análises espermáticas.....	51
7. DISCUSSÃO.....	52
8. CONCLUSÕES.....	59
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
ANEXOS.....	75

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Média $\pm$ desvio padrão da motilidade progressiva das células espermáticas, recuperadas de epidídimo de cães, do epidídimo de cães em meio diluidor sem antioxidante (Controle - C) e acrescido de diferentes concentrações (0,35, 0,25, 0,15mM) de N-acetilcisteína (NAC), Trolox (TR) ou a associação de ambos (NT) após avaliação in natura e após o período de refrigeração e congelação/descongelação . Jaboticabal, 2016.....	37
Tabela 2. Média $\pm$ desvio padrão do vigor de células espermáticas, recuperadas do epidídimo de cães em meio diluidor sem antioxidante (Controle - C) e acrescido de diferentes concentrações (0,35, 0,25, 0,15mM) de N-acetilcisteína (NAC), Trolox (TR) ou a associação de ambos (NT) após avaliação in natura e após o período de refrigeração e congelação/descongelação. Jaboticabal, 2016.....	38
Tabela 3. Média $\pm$ desvio padrão da integridade de membrada, pelo teste hiposmótico, das células espermáticas, recuperadas do epidídimo de cães em meio diluidor sem antioxidante (Controle - C) e acrescido de diferentes concentrações (0,35, 0,25, 0,15mM) de N-acetilcisteína (NAC), Trolox (TR) ou a associação de ambos (NT) após avaliação in natura e após o período de refrigeração e congelação/descongelação. Jaboticabal, 2016.....	40
Tabela 4. Média $\pm$ desvio padrão da integridade de membrada, pelo teste fluorescência, das células espermáticas, recuperadas do epidídimo de cães em meio diluidor sem antioxidante (Controle - C) e acrescido de diferentes concentrações (0,35, 0,25, 0,15mM) de N-acetilcisteína (NAC), Trolox (TR) ou a associação de ambos (NT) após avaliação in natura e após o	42

período de refrigeração e congelamento/descongelamento. Jaboticabal, 2016.....

Tabela 5.	Média $\pm$ desvio padrão das células espermáticas vivas, pelo teste eosina amarela, recuperadas do epidídimo de cães em meio diluidor sem antioxidante (Controle - C) e acrescido de diferentes concentrações (0,35, 0,25, 0,15mM) de N-acetilcisteína (NAC), Trolox (TR) ou a associação de ambos (NT) após avaliação in natura e após o período de refrigeração e congelamento/descongelamento. Jaboticabal, 2016.....	44
Tabela 6.	Média $\pm$ desvio padrão da produção do radical hidroxila/40x10 ⁶ espermatozoides recuperados do epidídimo de cães em meio diluidor sem antioxidante (Controle - C) e acrescido de diferentes concentrações (0,35, 0,25, 0,15mM) de N-acetilcisteína (NAC), Trolox (TR) ou a associação de ambos (NT) após avaliação in natura e após o período de refrigeração e congelamento/descongelamento. Jaboticabal, 2016.....	46
Tabela 7.	Média $\pm$ desvio padrão da produção das ROS, pelo teste TAC, dos espermatozoides recuperados do epidídimo de cães em meio diluidor sem antioxidante (Controle - C) e acrescido de diferentes concentrações (0,35, 0,25, 0,15mM) de N-acetilcisteína (NAC), Trolox (TR) ou a associação de ambos (NT) após avaliação in natura e após o período de refrigeração e congelamento/descongelamento. Jaboticabal, 2016.....	47
Tabela 8.	Média $\pm$ desvio padrão da mensuração do índice de atividade citoquímica, pelo método de coloração de DAB, dos espermatozoides recuperados do epidídimo de cães em meio diluidor sem antioxidante (Controle - C) e acrescido de diferentes concentrações (0,35, 0,25, 0,15mM) de N-acetilcisteína (NAC), Trolox (TR) ou a associação de ambos (NT) após avaliação in natura e após o período de refrigeração e congelamento/descongelamento. Jaboticabal, 2016.....	49

Tabela 9.	Coeficientes de correlação (significância) entre as variáveis: motilidade (MOT); vigor (VIG)); avaliação da integridade de membrana pelo teste hiposmótico (HIPO) e teste de fluorescência (FLUO); avaliação da vitalidade espermática pela coloração eosina (EOS); mensuração do índice de atividade citoquímica pela coloração de DAB (IAC); dos radicais hidroxila (TBARS) e do total de ROS (TAC), de amostras espermáticas oriundas de epidídimo canino, conservadas em meio Tris-gema, suplementado ou não com diferentes concentrações de Trolox e/ou NAC (0,15, 0,25 e 0,35mM), por 48 horas de refrigeração ou após congelação/descongelação. Jaboticabal, 2016.....	50
Tabela 10.	Coeficientes de correlação (significância) entre as variáveis espermáticas: motilidade (MOT); avaliação da integridade de membrana pelo teste hiposmótico (HIPO) e teste de fluorescência (FLUO); avaliação da vitalidade espermática pela coloração eosina (EOS); mensuração do índice de atividade citoquímica pela coloração de DAB (IAC); e a mensuração dos radicais hidroxila (TBARS FE) e do total de ROS (TAC FE) no fluido epididimário. Jaboticabal, 2016.....	51

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Diagrama da formação das unidades experimentais (UEs).....	25
Figura 2. Diagrama da divisão das 15 unidades experimentais (UEs), nos grupos experimentais (GE), e suas subdivisões, com adição de 0,35, 0,25 e 0,15mM de antioxidantes.....	26
Figura 3. Fluxograma do delineamento experimental. MOT: motilidade progressiva; VIG: vigor; HIPO: teste hiposmótico; VITAL: teste supra vital; FLUO: teste de fluorescência; TBARS: mensuração da lipoperoxidação; DAB: índice de atividade citoquímica; TAC: mensuração total de ROS.....	27
Figura 4. Fotomicrografia de contraste de fase de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico com membrana plasmática íntegra (seta preta) e membrana plasmática lesada (seta vermelha). Aumento de 400x.....	30
Figura 5. Fotomicrografia óptica de células espermáticas vivas (brancas – seta preta) e mortas (rosas – seta vermelha) após o teste supra vital, utilizando o corante eosina amarela. Aumento de 100x.....	31
Figura 6. Fotomicrografia de célula espermática com membrana plasmática lesada (vermelho – seta vermelha) e membrana plasmática íntegra (verde – seta branca), por meio dos corantes fluorescentes iodeto de propídio e 6- carboxifluoresceína. Microscópio de epifluorescência, aumento de 1250X.....	32
Figura 7. Fotomicrografia de células espermáticas avaliadas segundo a classificação da atividade mitocondrial, onde em 1 quase todas as mitocôndrias são ativas, em 2, segmentos ativos e inativos com predominância dos ativos, em 3, menos da metade da bainha mitocondrial ativa e com poucas mitocôndrias ativas dispersas e em 4, mitocôndrias completamente inativos, observados em microscópio com contraste de fases no aumento de 1000X.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
μL	Microlitros
ATP	Adenosina Tri-Fosfato
CCO	Citocromo C-Oxidase
DAB	3,3' Diaminobenzidina
DIC	Diacetato de carboxifluoresceína
FLUO	Fluorescência
GE	Grupo Experimental
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HIPO	Hiposmótico
IAC	Índice de Atividade Citoquímica
IP	Iodeto de propídio
MDA	Malonaldeído
mM	MiliMol
MOT	Motilidade
NAC	N-acetilcisteína
NT	Associação da N-acetilcisteína com o Trolox
O ₂	Oxigênio
O ₂ ⁻	Superóxido
OH ⁻	Radical Hidroxila
PUFAs	Ácidos Graxos Poliinsaturados
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SP	Espermatozoide
TAC	Total Antioxidant assay Kit
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TR	Trolox
TTR	Teste de Termo Resistência
UEs	Unidades Experimentais
VE	Vitamina E
VIG	Vigor

N-ACETILCISTEÍNA E TROLOX NA CONSERVAÇÃO DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS EPIDIDIMÁRIAS DE CÃES

RESUMO – O objetivo foi verificar se a suplementação do meio diluente Tris-gema com Trolox, N-acetilcisteína (NAC) ou a associação de ambos, em três concentrações distintas (0,15; 0,25 e 0,35mM), possibilitaria ou não a melhora na qualidade da preservação das células espermáticas nos processos de refrigeração e congelação. Foram utilizadas 15 unidades experimentais (UE), cada qual constituído pelo recuperado espermático de cinco cães hígdos (n=75) submetidos à orquiectomia eletiva. Estes, por sua vez, foram igualmente divididos em três grupos experimentais: grupo I (GI), II (GII) e III (GIII), os quais tiveram a adição de antioxidantes nas concentrações de 0,35, 0,25 e 0,15mM, respectivamente. Cada UE foi dividido em três partes, uma foi avaliada a In Natura, outra após a refrigeração por 48 horas, e a terceira após a congelação/ descongelação. Ato contínuo, cada parte foi subdividida em quatro amostras de igual volume, que foram centrifugadas e o sobrenadante armazenado. O concentrado de espermatozoides foi ressuscitado em meio diluente Tris-gema, puro, ou acrescido de Trolox, NAC ou de ambas. Os espermatozoides foram avaliados quanto à motilidade, vigor, teste vital, índice de atividade citoquímica, integridade de membrana, mensuração do total das espécies reativas de oxigênio e radical hidroxila. Os dados obtidos foram submetidos à análise de regressão logística Proc Glimmix e teste de correlação de Pearson ($p < 0,05$). Após a criopreservação foi observado que adição dos antioxidantes diminuiu a produção total de ROS. As concentrações e antioxidantes utilizados foram suficientes para manutenção da motilidade, integridade de membrana e atividade mitocondrial após a descongelação e refrigeração. Averiguou-se ainda que existe uma correlação positiva entre a quantidade total de ROS no fluido epididimário com o índice de atividade mitocondrial, e negativa com a integridade de membrana. Deste modo, concluímos que a adição destes antioxidantes em baixas concentrações foi benéfica à criopreservação do sêmen.

Palavras chaves: criopreservação, canídeos, espécie reativa de oxigênio, antioxidantes.

N-ACETYL CYSTEINE AND TROLOX IN CANINE EPIDYDIMAL SPERM CELLS CONSERVATION.

ABSTRACT - The aim of the present study was to evaluate whether the supplementation of the Tris egg-yolk extender with three different concentrations (0,15; 0,25 and 0,35mM) of N-acetyl cysteine (NAC), Trolox or the association of both, would improve the quality of sperm cells after chilling and freezing. Fifteen experimental units (EU), each one consisted by epididymal sperm recovered from five healthy dogs (n=75) after elective orchiectomy were used in this study. The EU were equally divided into three experimental groups. Group I (GI), II (GII) and III (GIII) had the addition of 0.35, 0.25 and 0.15mM of antioxidants, respectively. Each group was divided into three aliquots, the first one was evaluated at the moment of the collection, the second aliquot was chilled for 48 h and the third was frozen. Subsequently, each EU was divided into four aliquots of equal volume and immediately centrifuged, the supernatant was discarded and the concentrated sperm resuspended in TRIS extender supplemented with Trolox and/or N-acetyl cysteine. Sperm total and progressive motility, vital test, cytochemical activity indexes membrane integrity, and measurement of reactive oxygen species (ROS) by TBARS and TAC were performed. Data were statistically analyzed by logistic regression analysis Proc GLIMMIX and Pearson correlation test ($P < 0.05$). After cryopreservation the addition of antioxidants reduced total production of ROS. The concentrations and antioxidants chosen in this study were sufficient to maintain motility, membrane integrity and mitochondrial activity after thawing and cooling. A positive correlation was noticed between the total amount of ROS in the epididymal fluid with mitochondrial activity index, and negative correlation with membrane integrity. Thus, we conclude that the addition of these antioxidants in low concentrations was beneficial to the cryopreservation of semen

Key Words: cryopreservation, canids, reactive oxygen species, antioxidant

1. INTRODUÇÃO

A criopreservação dos espermatozoides oriundos do epidídimo visa manter a disponibilidade, a longo prazo, do material genético. Isto é particularmente importante para a conservação de espécies ameaçadas de extinção e para a geração de descendentes de indivíduos de alto valor genético que vieram a óbito ou ainda que sofreram orquiectomia com intuito terapêutico.

Com a criopreservação, há a ocorre maior produção das espécies reativas de oxigênio (ROS) e estas, em pequena quantidade, auxiliam o processo de capacitação espermática e fecundação; já em excesso, as ROS resultam em danos irreversíveis às células espermáticas, provocando a queda da motilidade, ruptura da membrana plasmática, desorganização da cromatina e até mesmo morte celular.

Deste modo, inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas pela adição de antioxidantes ao meio de refrigeração e congelação de células espermáticas, para verificar o efeito destes frente à ação das ROS (BILODEAU et al., 2001, THUWANUT et al., 2008, MICHAEL et al., 2009). Thuwanut e colaboradores (2008) adicionaram N-acetilcisteína (NAC) ou vitamina E, ambas na concentração de 5mM, ao meio diluidor de espermatozoides oriundos do epidídimo de gatos e obtiveram resultados positivos quando comparados ao grupo que não recebeu antioxidante.

Diferentemente do observado em relação aos espermatozoides obtidos de epidídimo felino (THUWANUT et al., 2008), a utilização de 5mM e 2,5mM de NAC he/ou Trolox adicionados ao meio diluente Tris-gema, para conservação das células espermáticas oriundas de epidídimo canino não mantiveram a viabilidade espermática após a refrigeração ou congelação/descongelação, entretanto a utilização de 0,5mM da associação de ambos antioxidantes promoveu melhora nos parâmetros espermáticos em comparação ao grupo controle (SAVI, 2012).

Deste modo, objetiva-se com o presente estudo, verificar se o uso de Trolox e NAC, em baixas concentrações, pode conferir proteção às células espermáticas provenientes de epidídimo canino durante os processos de refrigeração e congelação/descongelação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Epidídimo

O epidídimo consiste em um ducto longo e altamente contorcido, que conecta os ductos eferentes ao ducto deferente. Morfologicamente é dividido em três partes: cabeça, corpo e cauda (SISSON; GROSSMAN, 1986), que possui diversas funções, dentre elas: reabsorção do fluido oriundo dos túbulos seminíferos, promovendo a concentração e o transporte espermático; eliminação dos espermatozoides defeituosos; armazenamento das células espermáticas normais (MURADÁS et al., 2006) e alterações substanciais durante todo o trânsito dos espermatozoides pelas diferentes regiões do epidídimo permitindo a maturação gradual dos gametas masculinos, capacitação e reconhecimento e fertilização dos oócitos (FOUCHECOURT et al., 2000; ROBAIRE et al., 2006; TAJIK et al., 2007; COOPER, 2011; CONTRI et al., 2012; VARESI et al., 2013). A produção espermática nos mamíferos inicia-se no testículo e a maturação final ocorre no epidídimo (VARRICCHIO et al., 1996).

Diversas alterações morfofuncionais ocorrem nas células espermáticas durante a passagem pelo epidídimo, tais como: migração da gota citoplasmática da região proximal para a distal; início do ganho da motilidade progressiva e habilidade de reconhecimento e ligação ao oócito (JERVIS; ROBAIRE, 2001). Os processos correlacionados à maturação são mediados por proteínas provenientes de secreções do epitélio seminífero, que são componentes do fluido epididimário (JOHNSTON et al., 2001; SCHIMMING; VICENTINI; ORSI, 2001). Ainda em termos morfofuncionais, devido à baixa oxigenação e pH, os espermatozoides se mantêm estáticos e com pequeno consumo de energia, permitindo, assim, que atinjam a maturação no epidídimo. Este amadurecimento é promovido pela passagem de macromoléculas do citoplasma apical das células ao lúmen tubular (BARGMANN, 1968).

Os espermatozoides anormais são removidos principalmente durante a passagem pela cauda do epidídimo, pois este é o local de maior fagocitose e

dissolução celular (RAMAMOHANA et al., 1980). Além disso, a cauda do epidídimo é utilizada na recuperação dos espermatozoides, pois atua como reservatório de células espermáticas maduras, em repouso metabólico (SOSTARIC et al., 2008; CABALLERO; FRENETTE; SULLIVAN, 2011).

2.2. Técnicas de recuperação dos espermatozoides do epidídimo

A recuperação das células espermáticas da cauda do epidídimo e ducto deferente tem sido um método amplamente utilizado no âmbito da reprodução assistida. Este método possibilita maior dispersão e variabilidade genética e viabiliza o armazenamento de células espermáticas de espécies ameaçadas de extinção, animais de alto valor zootécnico e animais de companhia em condições patológicas adquiridas e *post mortem* (LUVONI et al., 2003; TSUTSUI et al., 2003). A obtenção de espermatozoides viáveis do epidídimo disponibiliza o seu uso em técnicas de reprodução assistida, como a inseminação artificial (PAPA et al., 2008; HEISE et al., 2010) e a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (HERRERA et al., 2006).

A recuperação dos espermatozoides da cauda do epidídimo também pode ser empregada em animais inaptos à reprodução, portadores de afecções que comprometam seu sucesso reprodutivo. Kline e colaboradores (2005) recuperaram espermatozoides de epidídimo de um cão de seis anos de idade castrado, acometido por hiperplasia prostática benigna; em seguida realizou-se a inseminação artificial in natura, comprovando a eficácia da técnica com o sucesso de uma ninhada com oito filhotes.

Inúmeras técnicas já foram descritas e variam de acordo com o autor e a espécie animal. Dessa forma, o método de colheita por lavagem retrógrada foi descrito em suínos e equinos (HEISE et al., 2010) e a técnica de fatiamento em caprinos, cervídeos, felinos, bovinos e caninos (FERNANDEZ-SANTOS et al., 2007; GAÑÁN; GOMENDIO; ROLDAN, 2009; MARTINS et al., 2009; MARTINS et al., 2012).

Em pequenos animais as técnicas mais utilizadas para a recuperação de células espermáticas são o método de flutuação e o método de compressão por pinças hemostáticas (YU; LEIBO, 2002; MARTINS et al., 2012).

O método de flutuação consiste no fatiamento ou perfuração da cauda do epidídimo e imersão em um meio gelatinoso. Em condições ideais (37°C, 5% de CO₂, 95% de O₂, por 10 minutos), os espermatozoides migram para o meio e, ato contínuo, são recuperados por meio de filtração (KAWAKAMI et al., 1993; YU; LEIBO, 2002).

Com relação à técnica de compressão por meio de pinças hemostáticas, ela tem sido utilizada com bons resultados, entretanto, exige maior habilidade, visto que o rompimento do ducto deferente, com perda do material espermático, é uma intercorrência comum. Neste sentido, a modificação desta técnica proposta por Savi et al. (2015), na qual a pinça hemostática é substituída pela lâmina de vidro, resultou em maior facilidade na execução da técnica e menor perda de material espermático.

2.3. A avaliação espermática

A avaliação das células espermáticas tem como objetivo prever a sua capacidade de fecundação para as técnicas de reprodução assistida (PEÑA et al., 2004). Compreender a etiologia dos espermatozoides defeituosos é uma tarefa complexa, multifacetada, que engloba não somente a capacidade dos espermatozoides em fecundar o oócito, mas também a sua competência para iniciar e sustentar o crescimento embrionário normal (RICE et al, 2000; ROBERTSON et al, 2009; LIU et al, 2012).

Um elemento central na capacidade de fertilização dos espermatozoides é o teor de lipídios presentes na membrana plasmática (CEROLINI et al., 1997), que é rica em ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs); além disso, sabe-se que a membrana plasmática de espermatozoides epididimários é menos fluida devido ao fato de não entrar em contato com o plasma seminal, provocando, assim, menor resistência ao procedimento de congelação-descongelação (JIMENEZ et al., 2013).

2.4. Função do plasma seminal

Diversos antioxidantes estão presentes no plasma seminal (MORETTI et al., 2004). A próstata é o único órgão acessório do sistema reprodutivo canino que secreta um fluido rico em ácido cítrico, cálcio, enzimas, proteínas e antioxidantes que protegem os espermatozoides, auxiliando na sua motilidade, sobrevivência e capacidade de fecundação (SIRIVAIIDYAPONG et al., 2001). Por esta razão, muitos estudos indicam que a congelabilidade dos espermatozoides oriundos do epidídimo canino é menor do que a dos espermatozoides provenientes do ejaculado (HORI et al., 2005; NOTHLING et al., 2007; PONGLOWHAPAN; CHATDARONG, 2008).

Apesar dos benefícios do fluido prostático, pesquisadores indicam que a sua adição aos espermatozoides tem efeito negativo sobre a integridade da cromatina (KOROCHKINA et al, 2014). Segundo Sirivaidyapon (2002), o acréscimo de fluido prostático na proporção de 1:1 após descongelação aumentou significativamente a motilidade espermática no primeiro momento de avaliação; no entanto, observou-se drástico declínio após três horas de incubação. Deste modo, ainda são necessárias pesquisas para afirmar se a presença do fluido prostático na criopreservação das células espermáticas é benéfica ou deletéria.

2.5 Análise espermática

A análise de apenas uma variável espermática é considerada insuficiente para a associação com a fertilidade, assim, a agregação de testes, como o hiposmótico, eosina, teste de termo resistência, dentre outros, permite obter resultados mais confiáveis (PEREZ et al., 1997; LARSSON; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2000).

Um dos parâmetros a ser considerado na avaliação espermática é o estudo da sua viabilidade (PINTADO; FUENTE; ROLDAN, 2000), que pode ser mensurada por meio de testes que avaliam a integridade da membrana plasmática, como o teste

hiposmótico, o supra vital e o de utilização de corantes fluorescentes (BRITO et al., 2003).

O teste hiposmótico avalia a atividade bioquímica da membrana plasmática em condições de hiposmolaridade. O espermatozoide é incubado em solução hiposmótica, onde ocorrem trocas de fluidos através da membrana plasmática, até que o equilíbrio osmótico seja atingido. O influxo de líquido promove a expansão da membrana plasmática, que resulta em aumento do volume celular e o enrolamento da cauda; todavia células espermáticas com membrana lesionada não sofrem expansão do volume celular mantendo, portanto, a cauda reta (CORREA; ZAVOS, 1994; ROTA et al., 2000).

Outro teste é o supra vital onde o corante (eosina) ao penetrar na membrana plasmática lesada, liga-se aos ácidos nucleicos, e confere uma coloração rosa ao espermatozoide lesado, diferentemente dos que possuem membrana íntegra que não são corados (BRITO et al., 2003; BRITO, 2007).

Semelhantemente ao teste supra vital, a técnica de fluorescência avalia a membrana lesada por meio da associação de dois fluorocromos: o iodeto de propídeo, que atravessa a membrana plasmática lesada ligando-se ao DNA da célula e conferindo-a coloração avermelhada; e o diacetato de 6-carboxifluoresceína, que penetra através da membrana íntegra e é hidrolisado por esterases não específicas, produzindo a fluoresceína, a qual fica retida por mais tempo dentro da célula e colore-a de verde (BRITO et al., 2003).

Estes dois últimos testes são indicadores de integridade da membrana plasmática, e devem estar atrelados ao teste hiposmótico, que demonstra pela atividade bioquímica espermática (BRITO et al., 2003). A avaliação da integridade de membrana juntamente com a atividade bioquímica espermática é de fundamental importância, pois se a membrana estiver intacta, porém bioquimicamente inativa, não ocorrerá fecundação (TARTAGLIONE; RITTA, 2004).

Além dessas avaliações, é importante verificar outras qualidades necessárias à fecundação, como a motilidade e o vigor espermáticos pois sem estas, o espermatozoide não consegue percorrer o trato genital feminino para ligar-se ao oócito (JANUSKAUSKAS et al., 2000; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2005).

A motilidade espermática é gerada pelo movimento flagelar da cauda, que por sua vez, resulta em alto gasto energético. A desfosforilação do adenosina tri-fosfato (ATP) é a principal fonte de energia consumida durante este processo e a quantidade de ATP necessária para garantir a motilidade, é produzida pelas mitocôndrias presentes na peça intermediária do espermatozoide (AITKEN, 1998).

Graças a esses dados, Hrudka (1987) desenvolveu um ensaio citotóxico apto a quantificar e qualificar a atividade da enzima Citocromo C-Oxidase (CCO) – enzima da cadeia respiratória responsável pela produção de ATP na célula espermática – através da 3,3'-diaminobenzidina (DAB).

2.6. Métodos de Criopreservação Espermática

A criopreservação tem como estratégia a utilização de baixas temperaturas para privação de energia e consequente preservação, de forma eficiente, da estrutura e função de células e tecidos vivos (BAUST, 2008). Este processo permite o armazenamento de espermatozoides caninos de raças raras e geneticamente valiosas, assim como de canídeos ameaçados de extinção (ENGLAND, 1993; FARSTAD, 2000).

A criopreservação de espermatozoides é um processo complexo e envolve muitos fatores que devem ser equilibrados para obter resultados satisfatórios, (PURDY, 2006) que permitam que as membranas plasmáticas sejam preservadas durante o período de estresse causado por alterações físicas e químicas que ocorrem durante o processo de criopreservação (GUERRA; EVANS; MAXWELL, 2004). Alguns fatores de estresse são a diluição do sêmen (MORETTI et al., 2004), a toxicidade do crioprotetor, meio diluidor e sua composição (HOLT, 2000), e, por fim, a diminuição da temperatura (WATSON, 2000).

De acordo com Peña et al. (2011), os espermatozoides sofrem lesões moleculares durante o processo de congelamento/descongelamento que podem levar à apoptose e comprometer o seu uso na inseminação artificial. Entretanto, a utilização de sêmen refrigerado ou descongelado na inseminação artificial elimina custos, tempo e riscos

de transporte dos animais, assim como permite a utilização do sêmen de reprodutores geneticamente superiores, tanto em âmbito nacional como internacional (ENGLAND; PONZIO, 1996).

A capacidade fertilizante dos espermatozoides oriundos de epidídimo de cães é mantida mesmo após o processo de congelação-descongelação (MARKS et al., 1994; HORI et al., 2004; KLINC et al., 2005), contudo, a criopreservação de espermatozoides está associada à redução da viabilidade celular e à capacidade de fertilização (PUKAZHENTHI et al., 2000). Ainda, a inseminação artificial com espermatozoides oriundos do epidídimo após a congelação/ descongelação resultou em baixas taxas de concepção (MARKS et al., 1994; HORI et al., 2004; HORI et al., 2011).

A redução da viabilidade espermática está correlacionada às alterações na membrana plasmática do espermatozoide (WATSON, 1995) e esses danos ocorrem devido a lavagens ou diluições que podem remover proteínas da membrana plasmática, alterando assim a composição da mesma (HAMMERSTEDT; FRAHAM; NOLAN, 1990; COLLIN; BAILEY, 1999). As proteínas, quando removidas, modificam a relação dos lipídios impedindo o processo de reação acrossomal, sendo que a estabilidade de lipídios na membrana plasmática é fundamental para manter a função espermática (WATSON, 1995).

Atualmente, consideram-se valores mínimos de 70% de motilidade e três de vigor para iniciar o processo de refrigeração e congelação; além disso, o meio de diluição deve possuir componentes e crioprotetores específicos, o processo deve apresentar curva de refrigeração, congelação/descongelação e armazenamento adequado, de forma a manter a viabilidade espermática (JOHNSTON et al., 2001).

2.7. Meio diluidor

Pesquisas têm sido realizadas na tentativa de desenvolver um meio diluidor que mantenha a qualidade dos espermatozoides durante o processo de criopreservação (ENGLAND, 1993; PONGLOWHAPAN et al., 2004; MARTINS et al.,

2009). O diluidor ideal deve atender a todas as necessidades das células espermáticas, como preservar a motilidade e a integridade da membrana plasmática, estabilizar o pH, neutralizar produtos tóxicos produzidos, proteger contra o choque térmico, manter o equilíbrio eletrolítico e a pressão osmótica; atuar como fonte energética, estabilizar sistemas enzimáticos, e inibir o crescimento bacteriano (ENGLAND, 1993).

O meio Tris-gema vem sendo estudado como um diluidor eficiente para conservação do espermatozoide epididimário canino (HEWITT et al. 2001, PONGLOWHAPAN et al. 2006). Sua principal característica é a utilização da gema de ovo, que contém principalmente fosfolipídios, proteínas, vitaminas, glicose e antioxidantes, que são úteis para proteger a integridade da membrana (MALO et al., 2011).

Espermatozoides de mamíferos precisam otimizar o consumo de energia para aumentar a contratilidade flagelar e assim assegurar a motilidade adequada. Açúcares têm sido incluídos nos diluentes como substratos energéticos e agentes de manutenção osmóticos (WATSON, 1979). A Frutose e a glicose são conhecidas por serem a principal fonte de energia para espermatozoides, além de serem encontradas naturalmente no plasma seminal (PONGLOWHAPAN et al., 2004).

Sendo assim, a escolha de meio diluidor com propriedades ideais para preservar a morfologia e função espermática pode ser a chave para o sucesso da criopreservação de espermatozoides (MARTINS et al., 2009). Devido aos efeitos deletérios dos radicais livres produzidos com a criopreservação, os antioxidantes têm sido adicionados ao meio diluidor, com intuito de conservar a qualidade destas células durante a criopreservação (MONTEIRO et al., 2009). Entretanto, as concentrações, tipos e combinações de antioxidantes são ainda controversas, necessitando assim da realização de mais estudos (BECCAGLI; ANASTASI; CHIGIONI, 2008).

2.8. Estresse oxidativo e Espécies Reativas de Oxigênio

Define-se como estresse oxidativo o desequilíbrio entre moléculas oxidantes (radicais livres) e antioxidantes que resulta em danos celulares. Os radicais livres, ou também denominados espécies reativas de oxigênio (ROS), são moléculas orgânicas

e inorgânicas eletricamente instáveis, que contêm um ou mais elétrons desemparelhados nos átomos de oxigênio ou nitrogênio e tendem a se ligar a outro elétron para atingir a estabilidade (HALLIWELL, 1994).

Atualmente, o termo radical livre não é o mais adequado, pois nem todas as ROS são oxidantes (MAIA, 2006). As espécies oxidantes agem como receptoras de elétrons, e outra classe das ROS são os agentes redutores, que atuam como doadores de elétrons (AGARWAL et al., 2005).

As ROS são produzidas principalmente nas mitocôndrias, pois nesta organela é gerada a energia necessária para manutenção celular através da fosforilação oxidativa (BARJA, 2007). Este processo de produção energética ocorre através de cinco complexos enzimáticos (BLIER; DUFRESNE; BURTON, 2001). Os complexos de I a IV (cadeia de transporte de elétrons) transportam o elétron por diversas proteínas até o oxigênio, este transporte é chamado de redução oxidativa. Dentro da normalidade, no fim do complexo IV, o oxigênio é convertido em água e a energia é reservada para utilização no complexo V, onde ocorrerá a produção de ATP. Contudo, uma pequena fração do oxigênio consumido pela mitocôndria no complexo IV, é transformada em radicais livres (DOWNLING; SIMMONS, 2009).

Dentre as principais ROS está o radical superóxido (O_2^- que é formado, quase que espontaneamente, em todas as células aeróbicas, principalmente na membrana plasmática, pela adição de um elétron à molécula de oxigênio. Este radical possui baixa capacidade de oxidação (ANDERSON, 1996; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; NORDBERG; ARNÉR, 2001).

O $OH^\cdot$, radical hidroxila, é produzido a partir da catalisação do peróxido de hidrogênio pela reação de Fenton, este radical apresenta pequena capacidade de difusão, todavia, é o mais reativo na indução de lesões celulares e, ainda, pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares, podendo causar mais danos do que qualquer outra ROS (ANDERSON, 1996; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; NORDBERG; ARNÉR, 2001; MAIA, 2006).

Por fim, o H_2O_2 , denominado peróxido de hidrogênio, não é considerado um radical livre verdadeiro, e sim um metabólito do oxigênio, extremamente deletério, capaz de atravessar a membrana nuclear e danificar o DNA por meio de reações

enzimáticas (ANDERSON, 1996; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; NORDBERG; ARNÉR, 2001; MAIA, 2006).

Apesar de toda a ação deletéria supracitada, as ROS exercem um papel importante no funcionamento do organismo, transportando elétrons na cadeia respiratória e atuando como moléculas sinalizadoras, quando em baixas concentrações (DOWNLING; SIMMONS, 2009).

2.9. ROS e função espermática

Desde a década de 1980 estuda-se a produção das ROS nas mitocôndrias presentes na peça intermediária da célula espermática (STOREY, 2008). Sabe-se que esta gênese indica a ativação de uma cascata apoptótica intrínseca (KOPPERS et al., 2011). Além disso, a produção destes radicais também pode estar presente devido aos leucócitos presentes no ejaculado (AITKEN; WEST; BUCKINGHAM, 1994; KRAUSZ et al., 1994; SHARMA et al., 2001) e a alta produção de ROS pode estar correlacionada às alterações morfológicas dos espermatozoides, uma vez que, células anormais são maiores produtoras de ROS do que as normais (AITKEN et al., 1994).

Esses radicais livres produzidos pelas células espermáticas resultam nos principais danos durante o processo de criopreservação, que é responsável pela depleção da adenosina trifosfato (ATP); dessa forma, há uma diminuição da motilidade, ocorrência de lesões e ruptura na membrana e cromatina espermáticas por meio da peroxidação lipídica (PERIS et al., 2007; WAKAMATSU et al., 2013). Os danos ocasionados pelas ROS foram primeiramente observados por MacLeod e colaboradores (1943), que incubaram espermatozoides humanos sob condições de alta tensão de oxigênio, fazendo-os perder rapidamente a mobilidade.

É sabido que espermatozoides de cães com diminuição significativa da motilidade e da integridade da membrana plasmática e porcentagem maior de células anormais, produzem maior quantidade de ROS em comparação aos espermatozoides morfolologicamente normais (TSELKAS et al., 2000).

Contudo, apesar da ação deletéria anteriormente citada, o estresse oxidativo possui importante fator de regulação da vitalidade e funcionalidade dos espermatozoides dos mamíferos (AITKEN; CURRY, 2011). Dentre esses fatores, destaca-se a habilidade de adquirir capacidade de fecundação e contribuir para a condensação da cromatina, remodelação da membrana intracelular e ativação de vias de sinalização (KODAMA et al., 1996; DE LAMIRANDE et al., 1997; PONS-REJRAJI et al., 2009).

Os espermatozoides dos mamíferos têm um sistema antioxidante enzimático que mantém o equilíbrio da produção das ROS e protege contra o estresse oxidativo. A quantidade de cada enzima é diferente entre as espécies, estando presente tanto no plasma seminal, quanto nos espermatozoides (CASSANI et al., 2005). A proteção enzimática intracelular é restrita, devido ao espaço citoplasmático limitado dos espermatozoides. Ele restringe a concentração e distribuição das enzimas antioxidantes intracelulares (SAWYER et al., 2003).

No trato genital masculino, os espermatozoides são menos vulneráveis às lesões das ROS, devido à presença de uma matriz extracelular altamente especializada em enzimas antioxidantes e baixa tensão de oxigênio (AITKEN; CURRY, 2011). Fora do trato genital masculino, os espermatozoides são extremamente sensíveis à peroxidação lipídica, e este processo pode ser prevenido ou revertido por meio de antioxidantes naturais ou artificiais adicionados ao meio de criopreservação (STOREY, 1997).

2.10. Antioxidantes

Os antioxidantes são substâncias capazes de equilibrar a produção das ROS, na tentativa de evitar o estresse oxidativo; atuando em diferentes níveis na proteção dos organismos. Primeiramente, impedem a sua formação, depois, interceptam os radicais livres gerados, inibindo o ataque sobre lipídios, aminoácidos das proteínas, dupla ligação dos ácidos graxos poli-insaturados e bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda da integridade celular. O terceiro e último mecanismo de

proteção é o reparo das lesões causadas pelos radicais, que está interligado com a reparação de danos da molécula de DNA e com a reconstituição das membranas celulares danificadas (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Uma gama de antioxidantes é produzida no organismo vivo para minimizar os efeitos das ROS (SHI et al., 2013). No entanto, durante a criopreservação, o papel da suplementação com antioxidantes para proteger os espermatozoides dos danos oxidativos ainda está sob investigação (VARESI, 2014).

Muitos antioxidantes vêm sendo estudados para a preservação da célula espermática, dentre eles, a vitamina E e a N-acetilcisteína (NAC). Ambos têm demonstrado efeitos significativos na proteção dos espermatozoides durante a criopreservação (MICHAEL et al., 2007; THUWANUT et al., 2008; TUNCER et al., 2010).

2.10.1. Trolox e Vitamina E

A vitamina E é considerada o principal componente do sistema antioxidante de espermatozoides e é um composto exógeno que pode ser obtido a partir da ingestão de alimentos, ou por meio da suplementação do meio diluidor (LENZI et al., 1996). Desempenha papel no sistema celular endógeno de defesa contra o estresse oxidativo, interrompendo a reação em cadeia que leva à peroxidação de lipídios presentes em membranas celulares e lipoproteínas plasmáticas (HELLER et al., 2004). Porém, quando em excesso, pode exercer efeito negativo através de atividade sequestradora excessiva, bloqueando assim a função fisiológica das ROS (AITKEN, 1995; O'FLAHERTY; DE LAMIRANDE; GAGNON, 2006). Pesquisas utilizando altas concentrações de vitamina E demonstraram que ela foi incapaz de preservar a qualidade do espermatozoide após descongelamento (FERNÁNDEZ-SANTOS et al., 2007).

O Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) é um análogo da vitamina E hidrossolúvel, com grande capacidade em capturar as ROS (MICKLE; WEISEL, 1993). A suplementação com Trolox do meio diluidor melhorou a qualidade de espermatozoides de javali durante o processo de refrigeração (PEÑA et

al., 2003) e congelação/descongelação de sêmen de cão (PEÑA et al., 2004), de sêmen de garanhão, após a refrigeração (BALL et al., 2001), de células espermáticas de cervos vermelhos, após a descongelação (DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO et al., 2009; MARTÍNEZ- PASTOR et al., 2008), de sêmen bovino após a descongelação (BORGES, 2008) e também em espermatozoides felinos (THUWANUT et al. 2008).

2.10.2. N-acetilcisteína (NAC)

Muitas propriedades da NAC foram observadas e utilizadas até os dias de hoje. No início da década de 60, sua propriedade mucolítica foi amplamente empregada (PIRIE; HELE, 1933). Em seguida, descobriu-se que a capacidade de reduzir a viscosidade do muco não era sua principal habilidade, pois ela atua como antagonista direto das espécies reativas de oxigênio e, especialmente, aumenta os níveis de cisteína intracelular (DE VIRIES; DE FLORA, 1993).

Com ação diferente do antioxidante anterior, a cisteína elimina os radicais livres através de interações químicas diretas com eles (BILODEAU et al., 2001). A N-acetilcisteína (NAC) é um importante precursor para a biossíntese de cisteína e glutathione intracelular (MAGNES; LI, 1980).

A suplementação de meios diluidores com cisteína ou o seu precursor tem demonstrado melhoras nas funções dos espermatozoides caninos, como motilidade e capacidade de fecundação (MICHAEL et al., 2007), assim como em felinos (THUWANUT et al., 2008), ovinos (BUCAK et al., 2007) e bovinos (BILODEAU et al., 2001, SARIOZKAN et al., 2009; TUNCER et al., 2010) após a criopreservação.

3. HIPÓTESE

A adição de pequenas concentrações de N-acetilcisteína e Trolox, isolados ou associados, ao meio diluente Tris-gema, auxiliam durante a criopreservação das células espermáticas oriundas de epidídimo canino.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Verificar como a adição de NAC e Trolox ao meio diluente Tris-gema, atuam na preservação das células espermáticas oriundas de epidídimo canino.

4.2. Objetivos Específicos

Averiguar dentre as concentrações 0,15, 0,25 e 0,35mM de N-acetilcisteína e/ou Trolox, qual é a mais indicada na criopreservação das células espermáticas oriundas de epidídimo canino, e se a associação destes antioxidantes é benéfico ou deletério em relação ao seu uso individual.

Investigar o efeito da N-acetilcisteína e/ou Trolox em diferentes concentrações sobre as células espermáticas submetidas à refrigeração por 48 horas e após descongelação.

Verificar se adição de N-acetilcisteína e/ou Trolox no meio diluente atua diminuindo a produção de ROS.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Animais

O presente estudo foi conduzido de acordo com os princípios éticos para experimentação animal (Comissão de Ética no Uso de Animais- CEUA, Protocolo 018813/09). Os animais foram provenientes da rotina do setor de Obstetrícia e Reprodução Animal do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, *campus* de Jaboticabal – UNESP. Setenta e cinco machos da espécie canina, sem predileção de raça, com idades entre um e cinco anos, considerados hígidos pela avaliação clínica, hematológica e bioquímica foram submetidos à orquiectomia eletiva (ANEXO A). Imediatamente após a retirada das gônadas, estas foram imersas em solução salina de NaCl 0,9% contidas em um frasco de vidro devidamente identificado e transportado para o laboratório em temperatura ambiente.

5.2. Obtenção do recuperado espermático

A obtenção das células espermáticas foi realizada por meio da técnica descrita por Savi et al.(2015). Dessa forma a cauda do epidídimo e o ducto deferente foram dissecados do testículo e plexo pampiniforme e mantidos com as extremidades ocluídas por meio de pinças hemostáticas. Uma gota (250µL) de ringer simples foi colocada na borda de uma placa de Petri de vidro estéril sob angulação de 45°.

O complexo cauda do epidídimo-ducto deferente foi posicionado na placa com extremidade do ducto deferente no interior da gota. Para obtenção das células espermáticas comprimiu-se (três vezes) a cauda do epidídimo em direção à extremidade livre do ducto deferente com auxílio de uma lâmina de vidro. A gota com espermatozoides foi recuperada e acondicionada no interior de um tubo plástico de

15mL para posterior análise. Procedeu-se nova lavagem da placa com mais 250µL de ringer simples, o qual também foi acrescentado ao mesmo tubo plástico contendo recuperado espermático.

5.3. Unidades experimentais

Os 75 cães foram divididos em 15 unidades experimentais (UEs) e cada uma delas (UEs) foi composta por um “pool” de células espermáticas provenientes do ducto deferente e epidídimo de cinco cães orquiectomizados. Os espermatozoides recuperados dos cinco animais foram armazenados em um tubo de 15mL, para posterior processamento e análise (Figura 1).

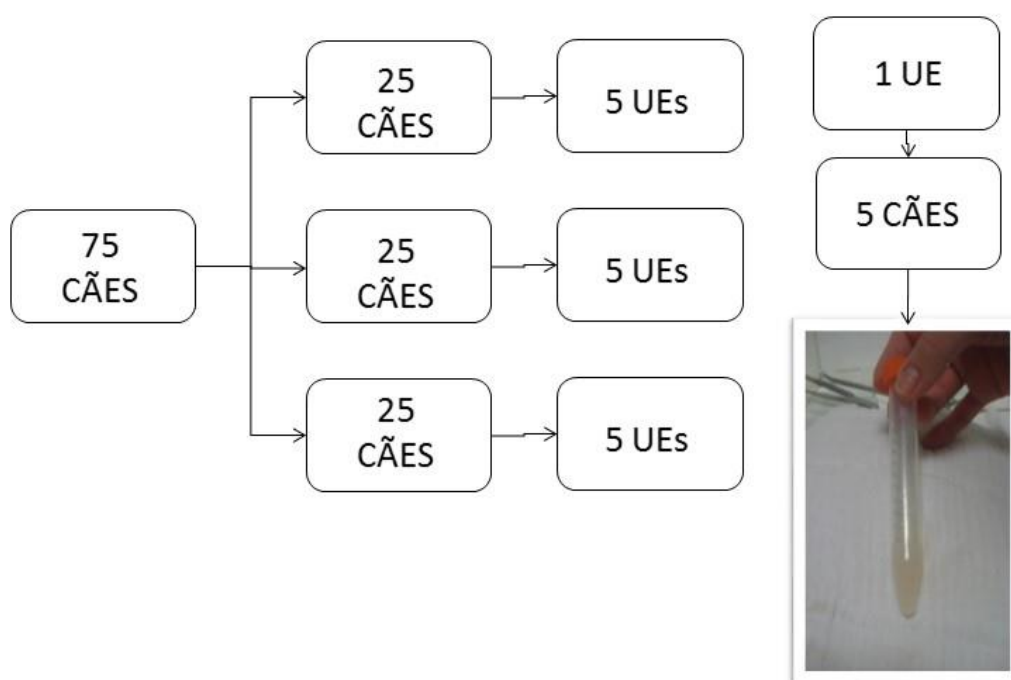


Figura 1. Diagrama da formação das unidades experimentais (UEs).

5.4. Grupos Experimentais

Cada grupo experimental (GE) foi composto por cinco unidades experimentais. Em cada GE, uma concentração de N-acetilcisteína e/ou Trolox (0,15, 0,25 ou 0,35mM) foi avaliada. Em todos os grupos, o antioxidante foi acrescentado para uma concentração de 80×10^6 espermatozoides/mL.

O conteúdo de cada UE foi fracionado em 12 partes, em seguida, estas partes foram centrifugadas à 800g por 10 minutos. Após este período, o sobrenadante (fluido epididimário) foi congelado para posterior análises e o sedimento ressuspendido em meio Tris-gema, onde três das alíquotas receberam Trolox (TR), outras três foram acrescidas de N-acetil-cisteína (NAC), outras três receberam a associação da Trolox com a N-acetil-cisteína (NT), e as três últimas não receberam antioxidante (Controle). Uma alíquota de cada tipo foi avaliada in natura, 10 minutos após a diluição, outra após 48 horas de refrigeração à 4°C, e a terceira após congelamento/descongelamento (Figura 2).

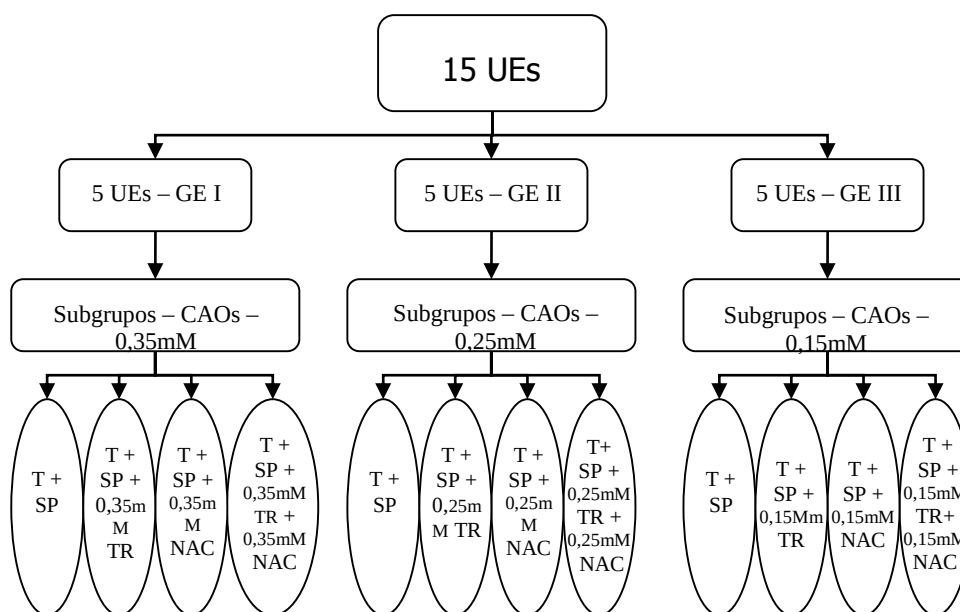


Figura 2. Diagrama da divisão das 15 unidades experimentais (UEs), nos grupos experimentais (GE), e suas subdivisões, com adição de 0,35, 0,25 e 0,15mM de antioxidantes. CAOs: Concentração de antioxidantes adicionados ao meio diluidor para cada 80×10^6 por mL espermatozoides; T: Meio diluidor TRIS; SP: Espermatozoides; TR: Antioxidante Trolox; NAC: Antioxidante N-acetilcisteína.

5.5. Refrigeração e congelamento

Uma amostra de cada subgrupo foi avaliada in natura, outra após as 48 horas de refrigeração à 4°C em container de transporte (Botutainer®) e a terceira após a descongelamento. Para o processo de congelamento, a amostra foi envasada em palhetas de 0,5 mL, com concentração de 40×10^6 espermatozoides cada uma, que foram transferidas para um refrigerador programado a 4°C durante 60 minutos. Transcorrido o período de equilíbrio, as palhetas foram transferidas a uma distância de 5cm do vapor de nitrogênio líquido por 20 minutos e então mergulhadas e armazenadas. Todas as amostras foram descongeladas à 70°C por oito segundos conforme descrito por Peña e Lindep-Forsberg (2000) (Figura 2).

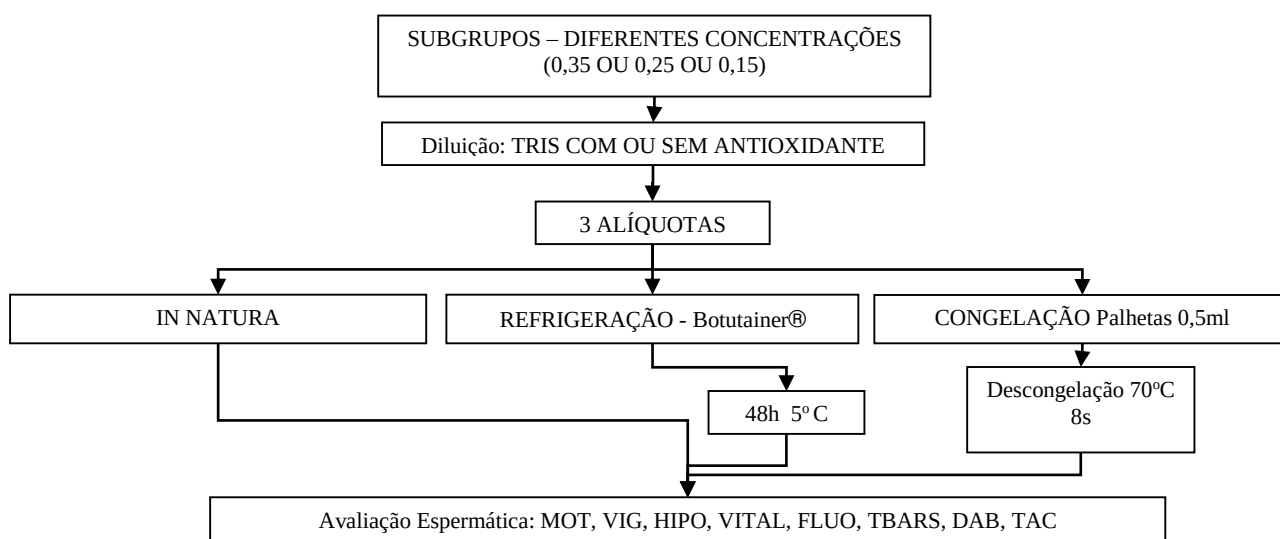


Figura 3. Fluxograma do delineamento experimental. MOT: motilidade progressiva; VIG: vigor; HIPO: teste hiposmótico; VITAL: teste supra vital; FLUO: teste de fluorescência; TBARS: mensuração da lipoperoxidação; DAB: índice de atividade citotóxica; TAC: mensuração total de ROS.

5.6. Meio Diluidor

Utilizou-se como meio diluidor o Tris-gema, composto por: ácido cítrico (1,7g), Hidroximetilaminometano – Tris (3g), frutose (1,25g), gema de ovo (20mL), amicacina

(0,02g), OEP (0,02%), glicerol (7 mL), utilizado apenas no meio destinado à congelação dos espermatozoides, e água destilada (100mL). Cada grupo experimental recebeu uma concentração de antioxidante utilizando o mesmo diluidor.

O meio diluidor foi totalmente preparado em uma partida, aliquotados em frações de 5mL, e ato contínuo foram congeladas a -20°C. As amostras foram descongeladas à temperatura ambiente para serem utilizadas.

5.7. Avaliação espermática

5.7.1. Concentração espermática

Foi realizada uma diluição de 1:20, ou seja, uma parte do material espermático para vinte partes de água deionizada. Em seguida, procedeu-se à leitura da amostra diluída em câmara de Neubauer. A concentração espermática foi realizada antes da ressuspensão do sedimento no meio Tris-gema com ou sem adição de antioxidante.

5.7.2. Morfologia espermática

Uma amostra do material foi diluída em 2,9% de citrato de sódio, juntamente com o corante descrito por POPE et al. (1991). Em seguida, incubou-se por 70 segundos, em temperatura ambiente, e logo após foi realizado um esfregaço em lâmina de vidro, no qual realizou-se a avaliação de 100 células, em microscópio de contraste de fase em objetiva de 1000x (CBRA, 1998).

5.7.3. Motilidade progressiva e vigor espermáticos

Uma gota de cada UE, foi colocada em lâmina e coberta por lamínula, pré-aquecidas a 37°C, e em seguida avaliada sob microscopia óptica de luz em aumento de 40 vezes. A motilidade progressiva foi mensurada, subjetivamente, sempre pelo mesmo avaliador, pela porcentagem de células móveis, variando de zero (todas as células imóveis) a 100 (todas as células em movimento), enquanto o vigor foi determinado pela qualidade de movimento progressivo dos espermatozoides, em escala de zero (nenhum movimento) a cinco (movimento retilíneo) (CBRA, 1998).

5.7.4. Teste hiposmótico

Este teste foi realizado de acordo com a técnica descrita por JEYENDRAN et al. (1984), em que se utiliza 1,0mL de uma solução com frutose na concentração de 100mOsm/Kg, acrescida de 20µL dos espermatozoides no meio diluidor. Essa solução foi incubada em banho maria a 37°C, durante 60 minutos. Após este período uma amostra foi colocada entre lâmina e lamínula, e então foram contadas 100 células em microscópio de contraste de fase, em aumento de 400x (ANEXO B).

As células foram classificadas quanto à presença (células integras) ou não (membrana plasmática lesada) da cauda enrolada (Figura 3). O número total de células espermáticas que apresentaram membrana plasmática íntegra foi obtido pela subtração do número de espermatozoides com cauda enrolada patológica do número daqueles com cauda enrolada resultantes do teste hiposmótico.



Figura 4. Fotomicrografia de contraste de fase de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico com membrana plasmática íntegra (seta preta) e membrana plasmática lesada (seta vermelha). Aumento de 400x.

5.7.5. Teste supra vital

Uma gota do material espermático de cada UE foi colocada em lâmina, em seguida colocou-se uma gota do corante eosina amarela e, ato contínuo, estas foram homogeneizadas, e o esfregaço foi confeccionado. A leitura foi realizada em microscópio de luz em aumento de 100x. Espermatozoides corados em rosa indicaram células mortas, já a ausência desta coloração representou células vivas (Figura 4). O resultado foi expresso em porcentagem de espermatozoides viáveis. Foram contadas 200 células espermáticas.

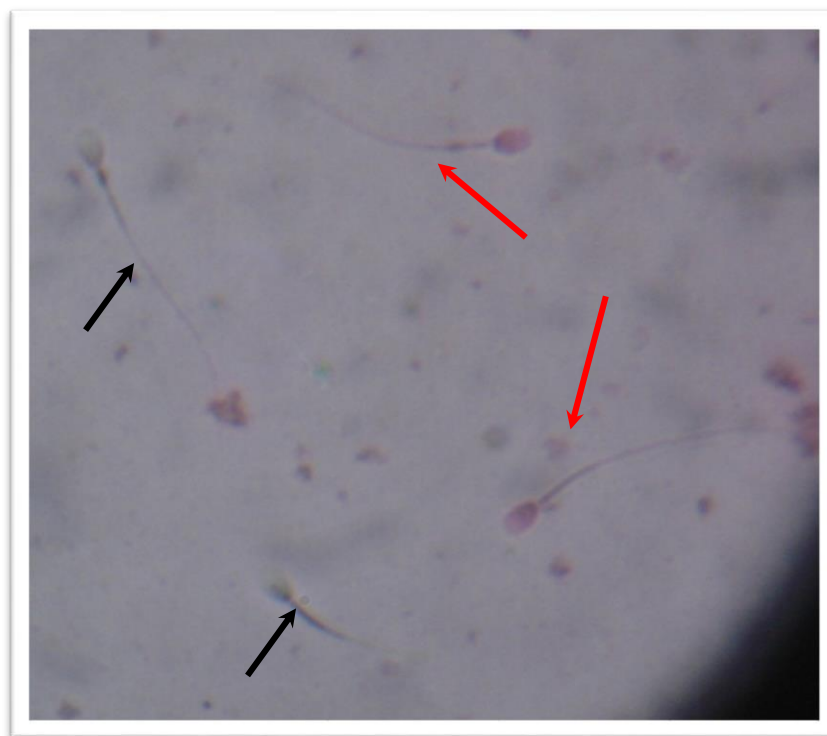


Figura 5. Fotomicrografia óptica de células espermáticas vivas (brancas – seta preta) e mortas (rosas – seta vermelha) após o teste supra vital, utilizando o corante eosina amarela. Aumento de 100x.

5.7.6. Teste de Fluorescência

O teste de fluorescência foi realizado de acordo com a técnica descrita por Harrison e Vickers (1990) e adaptada ao cão por Cunha et al. (1996) (ANEXO C). Uma gota do material foi depositada entre a lâmina e a lamínula e foi analisada em microscopia de epifluorescência (480-610nm) sob objetiva de 1250X. Foram contadas 100 células.

Os espermatozoides apresentaram as seguintes colorações (Figura 5):

- Íntegros – espermatozoides com membrana plasmática íntegra, células coradas pelo DIC, apresentando-se verde fluorescente em toda sua extensão.
- Lesados - espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal lesadas, células coradas pelo IP, apresentando-se vermelhas fluorescentes.

Todas as soluções foram preparadas ao abrigo da luz e foram mantidas congeladas a -20°C até o momento da análise dos espermatozoides.

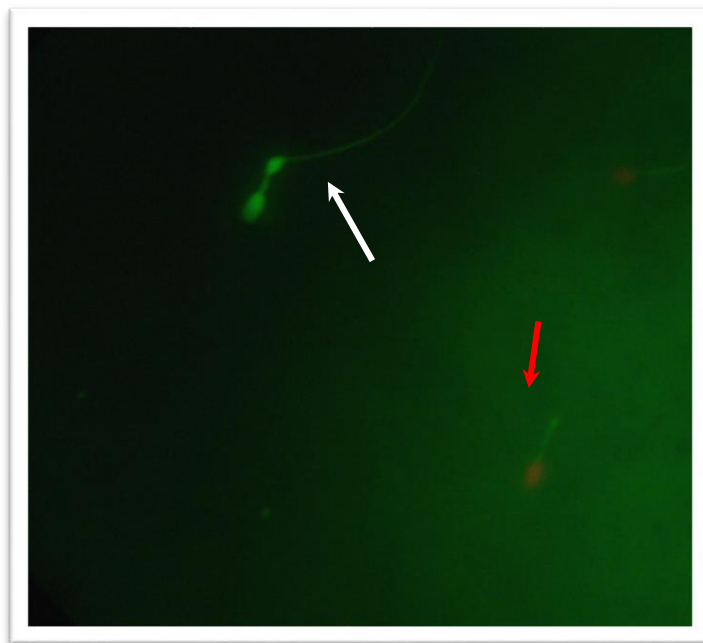


Figura 6. Fotomicrografia de célula espermática com membrana plasmática lesada (vermelho – seta vermelha) e membrana plasmática íntegra (verde – seta branca), por meio dos corantes fluorescentes iodeto de propídio e 6-carboxifluoresceína. Microscópio de epifluorescência, aumento de 1250X.

5.7.7. Teste de Atividade Citoquímica (Coloração DAB)

A atividade citoquímica foi determinada pelo método descrito por HRUDKA (1987). As avaliações foram realizadas em aumento de 1250X, sob óleo de imersão, usando microscopia de contraste de fase. Foram classificados 200 espermatozoides e a avaliação da atividade mitocondrial da peça intermediária seguiu a escala de quatro classes proposta por HRUDKA (1987) (ANEXO D), onde:

- Classe 1: quase todas as mitocôndrias são ativas, ou seja contém um produto de reação enegrecida dando a bainha mitocondrial a aparência de um cilindro compacto e proeminente;
- Classe 2: bainha mitocondrial parece fragmentada, isto é, consiste em segmentos ativos e inativos com predominância dos ativos;
- Classe 3: espermatozoides com menos da metade da bainha mitocondrial ativa e com poucas mitocôndrias ativas dispersas;
- Classe 4: espermatozoides completamente inativos (Figura 6).

Cada classe foi multiplicada por um fator de correção que segue 1=1,0, 2=0,5, 3=0,25, 4=0,0, atingindo assim o escore total.

Em seguida calculou-se o índice de atividade citoquímica (IAC).

$$\text{IAC} = \frac{\text{Escore total}}{\text{Número de espermatozoides classificados}} \times 100$$

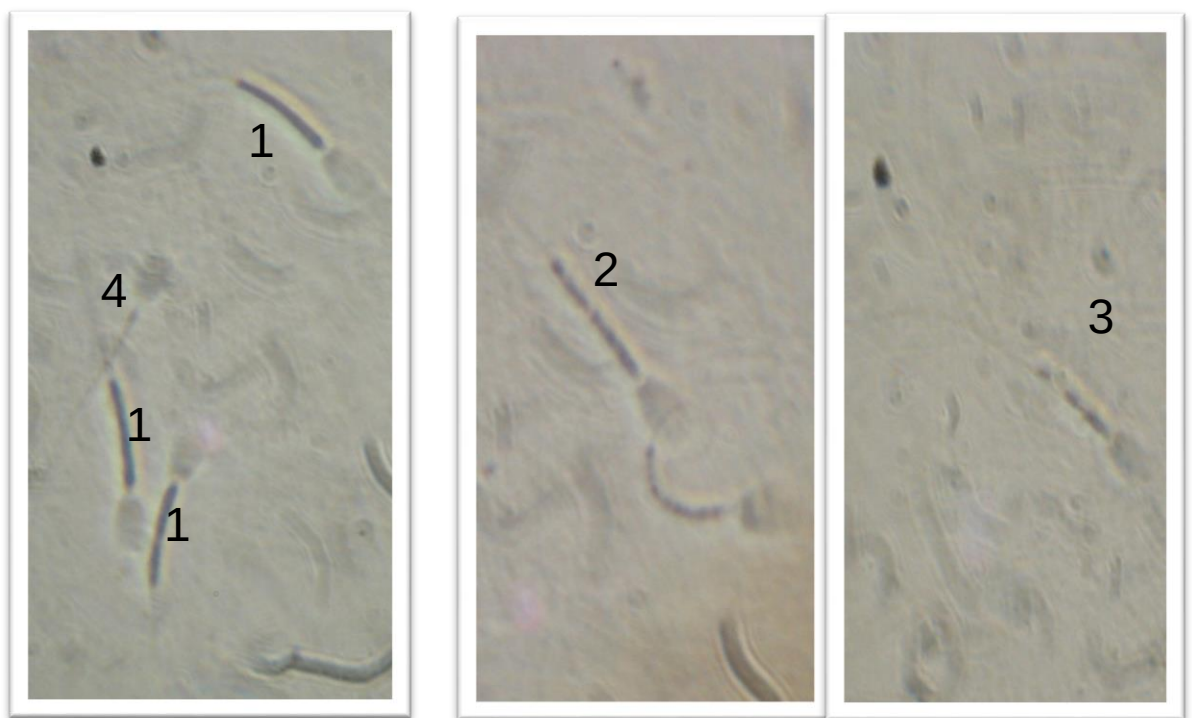


Figura 7. Fotomicrografia de células espermáticas avaliadas segundo a classificação da atividade mitocondrial, onde em 1 quase todas as mitocôndrias são ativas, em 2, segmentos ativos e inativos com predominância dos ativos, em 3, menos da metade da bainha mitocondrial ativa e com poucas mitocôndrias ativas dispersas e em 4, mitocôndrias completamente inativos, observados em microscópio com contraste de fases no aumento de 1000X.

5.8. Espécies Reativas de Oxigênio

5.8.1. Lipoperoxidação – radical hidroxila ($\text{OH}^\cdot$)

A extensão da degradação da desoxirribose por radicais hidroxila ($\text{OH}^\cdot$) gerados neste sistema foi mensurado pelo ensaio do ácido Tiobarbitúrico (TBA) descrito por Paya et al. (1992).

A mensuração foi realizada nas amostras de fluido epididimário e Tris-gema acrescidos de espermatozoides acrescidos ou não com antioxidantes. Estas foram adicionadas a solução descrita em anexo (ANEXO E). Ato continuo os tubos foram aquecidos a 100°C por 15 minutos e, então foram resfriados e centrifugados por 15 minutos a 1200g formando um precipitado.

O sobrenadante foi analisado ao espectrofotômetro. O cromógeno desenvolvido foi identificado por meio de leituras de absorbância em um comprimento de onda fixo de 532nm conforme metodologia descrita por Paya et al. (1992) determinando a quantidade de lipoperoxidação que ocorreu na amostra.

Os resultados de mensuração de lipoperoxidação foram expressos em nmol de TBARS mediante curva padrão de malondialdeído (MDA) realizada ao espectrofotômetro.

5.8.2. Total de Espécies Reativas de Oxigênio

Para a mensuração de radicais totais no fluido epididimário, as amostras foram previamente descongeladas em temperatura ambiente. Já em relação as amostras com meio diluente Tris-gema + espermatozoide acrescidas ou não de NAC e Trolox, as ROS foram mensuradas in natura, após 48 horas de refrigeração e após descongeladas as amostras.

Utilizou-se o kit específico da Sigma (Antioxidant Assay Kit CS0790), cujo princípio é a formação do radical ferril mioglobina, metmioglobina e peróxido de hidrogênio que oxida o ABTS (2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) levando a produção de um cátion ABTS⁺, um cromógeno solúvel de coloração esverdeada que pode ser determinado pelo espectrofotômetro num comprimento de 405nm.

As soluções estoques foram preparadas de acordo com o boletim técnico que acompanha o Kit.

O preparo foi realizado em placas de 96 poços onde foram adicionados sobre o sobrenadante 10µL da solução trabalho de Trolox, 20µL da solução trabalho de mioglobina, 150µL de solução trabalho de ABTS. Após 10 minutos, adicionou-se 100µL de solução STOP que se encontrava em temperatura ambiente, ato continuo realizou-se a leitura em absorbância de 405nm.

Para o conhecimento das concentrações de antioxidante foi construída uma curva padrão com as concentrações de Trolox conhecidas.

5.9. Análise estatística

Os pools formados pelos recuperado espermático de cinco cães, foram consideradas as unidades experimentais. Os dados obtidos foram expressos em médias $\pm$ desvio padrão e submetidos à análise de regressão logística utilizando-se o Proc Glimmix. Os fatores considerados para inclusão no modelo foram: meio diluidor, concentração, métodos de conservação e as interações dos fatores. As variáveis foram correlacionadas pelo método de Correlação de Pearson. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

As características morfológicas das células espermáticas recuperadas do epidídimo encontravam-se dentro dos valores de normalidade para a espécie canina (JOHNSTON, 1991). A concentração média observada foi de 1024×10^6 células espermáticas recuperadas por unidade experimental (UE).

6.1. Avaliação espermática

6.1.1. Motilidade e vigor

Nas avaliações in natura, não foram observadas alterações significativas em relação à motilidade e vigor iniciais (Tabelas 1 e 2).

Após 48 horas de refrigeração, destaca-se a adição de 0,15mM de Trolox, e de 0,25mM de NAC mais Trolox, para assegurar maior percentual da motilidade e vigor quando comparados aos demais grupos ($p < 0,05$); já na concentração de 0,35mM todos os antioxidantes juntos ou separados, foram significativos quando comparados ao grupo controle, porém, a NAC e esta somada ao Trolox mantiveram maior motilidade quando comparadas ao grupo enriquecido com Trolox. Observando ainda em relação ao mesmo tratamento, a adição de Trolox na concentração de 0,15mM, a de 0,35mM de NAC e 0,25mM da associação de ambos, promoveram melhores resultados quanto a manutenção dos parâmetros espermáticos ($p < 0,05$) (Tabela 1 e 2).

Por fim, após o processo de congelamento/descongelamento, a adição dos antioxidantes associados ou separados nas três concentrações resultaram positivamente na preservação da motilidade e vigor em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), e não foi observado diferença significativa entre as concentrações do mesmo tratamento (Tabela 1 e 2).

Tabela 1. Média $\pm$ desvio padrão da motilidade progressiva de células espermáticas, recuperadas do epidídimo de cães em meio diluidor sem antioxidante (Controle - C) e acrescido de diferentes concentrações (0,35, 0,25, 0,15mM) de N-acetilcisteína (NAC), Trolox (TR) ou a associação de ambos (NT) após avaliação in natura e após o período de refrigeração e congelamento/descongelamento. Jaboticabal, 2016.

[] mM	In Natura			
	C	TR	NAC	NT
0,35	81 $\pm$ 5,5 ^{Aa}	81 $\pm$ 5,5 ^{Aa}	81 $\pm$ 5,5 ^{Aa}	81 $\pm$ 5,5 ^{Aa}
0,25	77 $\pm$ 8,4 ^{Aa}	77 $\pm$ 8,4 ^{Aa}	77 $\pm$ 8,4 ^{Aa}	77 $\pm$ 8,4 ^{Aa}
0,15	74 $\pm$ 4,2 ^{Aa}	74 $\pm$ 4,2 ^{Aa}	74 $\pm$ 4,2 ^{Aa}	74 $\pm$ 4,2 ^{Aa}
	Refrigerado			
	C	TR	NAC	NT
0,35	44 $\pm$ 5,6 ^{Ca}	57 $\pm$ 7,6 ^{Bab}	68 $\pm$ 6,7 ^{Aa}	58 $\pm$ 12,5 ^{Aab}
0,25	38 $\pm$ 10,4 ^{Ba}	49 $\pm$ 9,6 ^{Bb}	53 $\pm$ 12,0 ^{Bb}	64 $\pm$ 6,5 ^{Aa}
0,15	45 $\pm$ 16,6 ^{Ba}	62 $\pm$ 7,6 ^{Aa}	46 $\pm$ 12,9 ^{Bb}	47 $\pm$ 8,4 ^{Bb}
	Descongelado			
	C	TR	NAC	NT
0,35	19 $\pm$ 4,2 ^{Ca}	27 $\pm$ 4,4 ^{Ba}	38 $\pm$ 14,4 ^{Aa}	27 $\pm$ 8,3 ^{Ba}
0,25	19 $\pm$ 8,2 ^{Ba}	34 $\pm$ 9,6 ^{Aa}	36 $\pm$ 9,6 ^{Aa}	35 $\pm$ 14,6 ^{Aa}
0,15	15 $\pm$ 7,9 ^{Ba}	27 $\pm$ 4,4 ^{Aa}	29 $\pm$ 8,9 ^{Aa}	33 $\pm$ 14,4 ^{Aa}

^{Aa} Para valores diferentes entre os tratamentos na mesma concentração, na mesma linha $p < 0,05$.

^{ab} Para valores diferentes entre as concentrações no mesmo tratamento, na mesma coluna $p < 0,05$.

Tabela 2. Média $\pm$ desvio padrão do vigor de células espermáticas, recuperadas do epidídimo de cães em meio diluidor sem antioxidante (Controle - C) e acrescido de diferentes concentrações (0,35, 0,25, 0,15mM) de N-acetilcisteína (NAC), Trolox (TR) ou a associação de ambos (NT) após avaliação in natura e após o período de refrigeração e congelamento/descongelamento. Jaboticabal, 2016.

[] mM	In Natura			
	C	TR	NAC	NT
0,35	3,9 $\pm$ 0,2 ^{Aa}	3,9 $\pm$ 0,2 ^{Aa}	3,9 $\pm$ 0,2 ^{Aa}	3,9 $\pm$ 0,2 ^{Aa}
0,25	4,0 $\pm$ 0,0 ^{Aa}	4,0 $\pm$ 0,0 ^{Aa}	4,0 $\pm$ 0,0 ^{Aa}	4,0 $\pm$ 0,0 ^{Aa}
0,15	3,6 $\pm$ 0,4 ^{Aa}	3,6 $\pm$ 0,4 ^{Aa}	3,6 $\pm$ 0,4 ^{Aa}	3,6 $\pm$ 0,4 ^{Aa}
	Refrigerado			
	C	TR	NAC	NT
0,35	3,0 $\pm$ 0,2 ^{Ba}	3,0 $\pm$ 0,5 ^{Bb}	4,0 $\pm$ 0,2 ^{Aa}	3,0 $\pm$ 0,6 ^{Ba}
0,25	2,7 $\pm$ 0,5 ^{Ba}	3,0 $\pm$ 0,4 ^{ABab}	2,7 $\pm$ 0,7 ^{ABb}	3,1 $\pm$ 0,4 ^{Aa}
0,15	2,8 $\pm$ 0,3 ^{Ba}	3,3 $\pm$ 0,3 ^{Aa}	2,6 $\pm$ 0,2 ^{Bb}	2,8 $\pm$ 0,3 ^{Ba}
	Descongelado			
	C	TR	NAC	NT
0,35	2,1 $\pm$ 0,3 ^{Ba}	3,0 $\pm$ 0,2 ^{Aa}	3,0 $\pm$ 0,5 ^{Aa}	2,8 $\pm$ 0,6 ^{Aa}
0,25	2,5 $\pm$ 0,7 ^{Ba}	2,8 $\pm$ 0,4 ^{Aa}	2,9 $\pm$ 0,4 ^{Aa}	2,9 $\pm$ 0,4 ^{Aa}
0,15	2,0 $\pm$ 0,8 ^{Ba}	3,1 $\pm$ 0,4 ^{Aa}	3,0 $\pm$ 0,3 ^{Aa}	2,9 $\pm$ 0,2 ^{Aa}

^{AB} Para valores diferentes entre os tratamentos na mesma concentração, na mesma linha $p < 0,05$.

^{ab} Para valores diferentes entre as concentrações no mesmo tratamento, na mesma coluna $p < 0,05$.

6.1.2. Avaliação da integridade da membrana

Em relação ao teste hiposmótico, apesar do percentual de espermatozoides com membranas íntegras avaliadas in natura não obterem resultados significativos, nas amostras enriquecidas com antioxidantes em relação ao grupo controle, foi observada menor lesão de membrana nos espermatozoides que receberam adição de 0,35mM de Trolox e/ou NAC, quando comparado a estes mesmos antioxidantes nas demais concentrações (0,15mM e 0,25mM) (Tabela 3).

Ainda, em relação ao teste hiposmótico, a suplementação com 0,35mM de Trolox, NAC e ambos associados, e a adição de 0,15mM de Trolox, conservaram maior manutenção da integridade de membrana espermática após a refrigeração por 48 horas, quando comparado ao grupo que não recebeu antioxidante ($p < 0,05$). Quando comparadas as concentrações do mesmo antioxidante, apenas a adição de NAC à 0,35mM recebeu destaque em relação às concentrações de 0,25 e 0,15mM. Já entre as concentrações de Trolox e este associado a NAC, nenhuma concentração foi significativa após 48 horas de refrigeração na manutenção da integridade celular (Tabela 3).

Após o período de congelação/descongelação não houve diferença significativa na quantidade de células com membranas íntegras, entre as concentrações observadas dentro do mesmo tratamento. Todavia, entre estes pode se destacar na concentração de 0,35mM o uso da NAC isolada ou associada ao Trolox resultados superiores ao grupo controle na manutenção da integridade de membrana. O mesmo efeito foi observado na adição dos dois antioxidantes juntos ou isolados na concentração de 0,25mM. Em contrapartida, quando adicionado 0,15mM dos antioxidantes ao meio diluidor Tris-gema, não se observou diferenças significativas em relação ao grupo controle ($p > 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3. Média $\pm$ desvio padrão da integridade de membrada, pelo teste hiposmótico, das células espermáticas, recuperadas do epidídimo de cães em meio diluidor sem antioxidante (Controle - C) e acrescido de diferentes concentrações (0,35, 0,25, 0,15mM) de N-acetilcisteína (NAC), Trolox (TR) ou a associação de ambos (NT) após avaliação in natura e após o período de refrigeração e congelamento/descongelamento. Jaboticabal, 2016.

[] mM	In Natura			
	C	TR	NAC	NT
0,35	85,4 $\pm$ 7,7 ^{Aa}	82,2 $\pm$ 5,6 ^{Aa}	85,0 $\pm$ 6,9 ^{Aa}	81,4 $\pm$ 4,6 ^{Aa}
0,25	71,8 $\pm$ 9,4 ^{Aa}	71,0 $\pm$ 6,9 ^{Ab}	71,4 $\pm$ 5,3 ^{Ab}	71,4 $\pm$ 7,4 ^{Aab}
0,15	72,8 $\pm$ 9,3 ^{Aa}	75,0 $\pm$ 7,0 ^{Aab}	68,4 $\pm$ 7,2 ^{Ab}	68,2 $\pm$ 7,0 ^{Ab}
	Refrigerado			
	C	TR	NAC	NT
0,35	64,2 $\pm$ 4,5 ^{Ba}	68,2 $\pm$ 5,4 ^{Aa}	77,6 $\pm$ 5,5 ^{Aa}	69,0 $\pm$ 10,3 ^{Aa}
0,25	59,4 $\pm$ 3,2 ^{Aa}	62,4 $\pm$ 4,8 ^{Aa}	65,2 $\pm$ 6,7 ^{Ab}	63,4 $\pm$ 7,7 ^{Aa}
0,15	49,8 $\pm$ 15,1 ^{Ba}	66,8 $\pm$ 9,7 ^{Aa}	56,4 $\pm$ 14,3 ^{ABb}	58,4 $\pm$ 7,0 ^{Ab}
	Descongelado			
	C	TR	NAC	NT
0,35	27,8 $\pm$ 6,6 ^{Ba}	30,8 $\pm$ 5,5 ^{ABa}	41,6 $\pm$ 11,3 ^{Aa}	38,4 $\pm$ 9,4 ^{Aa}
0,25	24,4 $\pm$ 7,2 ^{Ba}	41,0 $\pm$ 14,8 ^{Aa}	39,0 $\pm$ 10,7 ^{Aa}	38,0 $\pm$ 10,7 ^{Aa}
0,15	26,0 $\pm$ 12,5 ^{Aa}	28,2 $\pm$ 5,6 ^{Aa}	31,2 $\pm$ 10,7 ^{Aa}	31,0 $\pm$ 12,7 ^{Aa}

^{AB} Para valores diferentes entre os tratamentos na mesma concentração, na mesma linha $p < 0,05$.

^{ab} Para valores diferentes entre as concentrações no mesmo tratamento, na mesma coluna $p < 0,05$.

Em relação à avaliação da integridade de membrana pelo teste fluorescência, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos in natura, idem à adição dos antioxidantes nas concentrações de 0,25 e 0,15mM após o período de 48 horas de refrigeração. No entanto, após o mesmo período, o acréscimo da NAC e do Trolox, associados ou separados, teve efeito significativo na preservação da integridade espermática, na concentração 0,35mM, quando comparado ao grupo controle que não recebeu adição de antioxidante ($p < 0,05$) (Tabela 4).

Contudo, quando observamos dentro de um mesmo tratamento as diferentes concentrações, a adição de 0,35mM dos antioxidantes isolados ou associados, foi superior às demais concentrações (0,25 e 0,15mM) na manutenção da integridade da membrana espermática no período a in natura e após 48 horas de refrigeração ($p < 0,05$) (Tabela 4)

Após o período de congelação/ descongelação apenas a adição do Trolox na concentração de 0,25mM foi superior na manutenção da integridade espermática quando comparada ao grupo controle, além disso, essa concentração também foi superior às demais concentrações utilizadas (0,35 e 0,15mM) de Trolox ($p < 0,05$). Dentro dos outros tratamentos não houve diferença significativa entre as concentrações testadas ($p > 0,05$). (Tabela 4)

Tabela 4. Média $\pm$ desvio padrão da integridade de membrada, pelo teste fluorescência, das células espermáticas, recuperadas do epidídimo de cães em meio diluidor sem antioxidante (Controle - C) e acrescido de diferentes concentrações (0,35, 0,25, 0,15mM) de N-acetilcisteína (NAC), Trolox (TR) ou a associação de ambos (NT) após avaliação in natura e após o período de refrigeração e congelamento/descongelamento. Jaboticabal, 2016..

[] mM	In Natura			
	C	TR	NAC	NT
0,35	85,8 $\pm$ 7,6 ^{Aa}	80,2 $\pm$ 5,8 ^{Aa}	86,0 $\pm$ 6,2 ^{Aa}	84,6 $\pm$ 5,0 ^{Aa}
0,25	67,2 $\pm$ 15,5 ^{Aa}	64,4 $\pm$ 8,7 ^{Ab}	62,0 $\pm$ 4,3 ^{Ab}	69,2 $\pm$ 6,9 ^{Ab}
0,15	63,8 $\pm$ 12,0 ^{Aa}	67,2 $\pm$ 11,4 ^{Ab}	65,4 $\pm$ 8,7 ^{Ab}	65,8 $\pm$ 9,0 ^{Ab}
	Refrigerado			
	C	TR	NAC	NT
0,35	64,6 $\pm$ 6,5 ^{Ba}	70,2 $\pm$ 5,6 ^{Aa}	80,8 $\pm$ 6,1 ^{Aa}	73,4 $\pm$ 11,5 ^{Aa}
0,25	56,6 $\pm$ 10,5 ^{Aa}	55,0 $\pm$ 11,7 ^{Ab}	65,6 $\pm$ 7,6 ^{Ab}	62,8 $\pm$ 9,3 ^{Aab}
0,15	49,2 $\pm$ 16,0 ^{Aa}	65,4 $\pm$ 5,7 ^{Aab}	56,4 $\pm$ 13,5 ^{Ab}	59,8 $\pm$ 8,0 ^{Ab}
	Descongelado			
	C	TR	NAC	NT
0,35	29,0 $\pm$ 6,2 ^{Aa}	32,0 $\pm$ 5,8 ^{Aab}	34,4 $\pm$ 12,7 ^{Aa}	37,0 $\pm$ 12,2 ^{Aa}
0,25	30,0 $\pm$ 8,6 ^{Ba}	44,0 $\pm$ 11,9 ^{Aa}	37,2 $\pm$ 11,7 ^{ABa}	36,8 $\pm$ 13,9 ^{ABa}
0,15	30,6 $\pm$ 13,4 ^{Aa}	26,8 $\pm$ 5,8 ^{Ab}	31,6 $\pm$ 14,4 ^{Aa}	27,8 $\pm$ 12,7 ^{Aa}

^{AB} Para valores diferentes entre os tratamentos na mesma concentração, na mesma linha $p < 0,05$.

^{ab} Para valores diferentes entre as concentrações no mesmo tratamento, na mesma coluna $p < 0,05$.

6.1.3. Teste Vital

Na avaliação da vitalidade espermática, não foi observada diferença estatística entre os tratamentos e nem entre as concentrações de um mesmo antioxidante em células espermáticas avaliadas in natura ($p > 0,05$) (Tabela 5).

A suplementação com 0,15mM de Trolox conservou maior percentual de células espermáticas vivas após a refrigeração por 48 horas, quando comparado ao grupo que não recebeu antioxidante ($p < 0,05$); o mesmo foi observado após a adição de 0,35mM de NAC e NT; em relação à adição de 0,25mM de antioxidantes, não houve diferença em relação ao grupo controle ($p > 0,05$) (Tabela 5).

Ainda após 48 horas de refrigeração, observando as diferentes concentrações dentro de um mesmo tratamento, verificou-se que a concentração de 0,35mM de NAC e esta associada ao Trolox foi superior na manutenção da vitalidade espermática quando comparada às concentrações de 0,25 e 0,25mM dos antioxidantes citados ($p < 0,05$). Dentre as concentrações de Trolox não houve diferença significativa ($p > 0,05$).

Após a descongelação das células espermáticas, as amostras acrescidas de 0,25mM e 0,35mM de NAC; 0,25mM de Trolox, ou 0,15mM, 0,25mM e 0,35mM da associação de ambos antioxidantes foram benéficas para manutenção da vitalidade quando comparadas ao grupo controle ($p < 0,05$). Conquanto em relação as concentrações de um mesmo antioxidantes, apenas a NAC na concentração de 0,35mM foi significativa em relação as demais concentrações, promovendo melhores resultados (0,25 e 0,15mM) ($p < 0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5. Média $\pm$ desvio padrão das células espermáticas vivas, pelo teste eosina amarela, recuperadas do epidídimo de cães em meio diluidor sem antioxidante (Controle - C) e acrescido de diferentes concentrações (0,35, 0,25, 0,15mM) de N-acetilcisteína (NAC), Trolox (TR) ou a associação de ambos (NT) após avaliação in natura e após o período de refrigeração e congelamento/descongelamento. Jaboticabal, 2016.

[] mM	In Natura			
	C	TR	NAC	NT
0,35	78,2 $\pm$ 7,7 ^{Aa}	77,4 $\pm$ 6,2 ^{Aa}	78,2 $\pm$ 6,3 ^{Aa}	78,0 $\pm$ 3,4 ^{Aa}
0,25	72,8 $\pm$ 7,7 ^{Aa}	68,4 $\pm$ 6,9 ^{Aa}	70,2 $\pm$ 4,1 ^{Aa}	72,8 $\pm$ 8,1 ^{Aa}
0,15	72,8 $\pm$ 6,2 ^{Aa}	76,6 $\pm$ 4,0 ^{Aa}	67,8 $\pm$ 3,7 ^{Aa}	69,6 $\pm$ 4,3 ^{Aa}
	Refrigerado			
	C	TR	NAC	NT
0,35	64,8 $\pm$ 5,0 ^{Ca}	65,8 $\pm$ 5,3 ^{BCa}	77,4 $\pm$ 3,5 ^{Aa}	67,8 $\pm$ 9,6 ^{ABa}
0,25	57,2 $\pm$ 6,0 ^{Aa}	64,4 $\pm$ 5,7 ^{Aa}	60,6 $\pm$ 11,9 ^{Ab}	65,2 $\pm$ 5,7 ^{Aab}
0,15	48,4 $\pm$ 12,4 ^{Ba}	67,2 $\pm$ 9,2 ^{Aa}	54,4 $\pm$ 13,5 ^{Bb}	55,6 $\pm$ 6,4 ^{Bb}
	Descongelado			
	C	TR	NAC	NT
0,35	27,6 $\pm$ 9,4 ^{Ca}	29,4 $\pm$ 7,9 ^{BCa}	42,0 $\pm$ 12,5 ^{Aa}	38,2 $\pm$ 7,8 ^{ABa}
0,25	22,6 $\pm$ 5,6 ^{Ba}	37,6 $\pm$ 18,2 ^{Aa}	36,0 $\pm$ 10,2 ^{Aab}	38,6 $\pm$ 10,4 ^{Aa}
0,15	28,2 $\pm$ 13,0 ^{Ba}	28,4 $\pm$ 4,5 ^{Ab}	29,4 $\pm$ 8,9 ^{ABb}	35,2 $\pm$ 13,4 ^{Aa}

^{AB} Para valores diferentes entre os tratamentos na mesma concentração, na mesma linha $p < 0,05$.

^{ab} Para valores diferentes entre as concentrações no mesmo tratamento, na mesma coluna $p < 0,05$.

6.1.4. Lipoperoxidação – Mensuração da produção do radical $\text{OH}^\cdot$

Os resultados da mensuração dos radicais hidroxila pelo teste TBARS foram controversos. Sendo que nas amostras acrescidas de 0,25mM de Trolox, avaliadas in natura, observou-se a diminuição da produção desse radical, quando comparado ao grupo controle, porém nas amostras que receberam 0,15mM de Trolox ou de NAC, os valores de hidroxilas encontrados foram maiores do que no grupo controle ($p < 0,05$). Ainda, avaliando as concentrações de um mesmo antioxidante, a adição de 0,25mM de Trolox, NAC e ambas associadas foi superior na manutenção da produção de hidroxilas quando comparado a estes nas concentrações de 0,35 e 0,15mM em células espermáticas avaliadas in natura ($p < 0,05$) (Tabela 6).

Após a refrigeração por 48 horas, não houve diminuição da produção de hidroxilas com adição dos diferentes antioxidantes ($p > 0,05$), salvo a adição de 0,15mM de Trolox, que contribuiu para o aumento da produção deste radical ($p < 0,05$). Entre as concentrações utilizadas destacou-se a de 0,25mM em comparação à adição de 0,15mM e 0,35mM dos antioxidantes ($p < 0,05$) (Tabela 6).

Por fim, após o período de congelação/descongelação não houve diferença entre os tratamentos nas duas maiores concentrações (0,35 e 0,25mM) ($p > 0,05$), todavia a adição de 0,15mM dos antioxidantes juntos ou isolados aumentou a mensuração de hidroxilas ($p < 0,05$),

Quando comparadas as concentrações de um mesmo antioxidante, a adição de 0,25mM de Trolox e de 0,35 e 0,25mM de NAC e NT foram superiores às demais concentrações na manutenção da produção de hidroxilas após a congelação/descongelação ($p < 0,05$) (Tabela 6)

Tabela 6. Média $\pm$ desvio padrão da produção do radical hidroxila/ 40×10^6 espermatozoides recuperados do epidídimo de cães em meio diluidor sem antioxidante (Controle - C) e acrescido de diferentes concentrações (0,35, 0,25, 0,15mM) de N-acetilcisteína (NAC), Trolox (TR) ou a associação de ambos (NT) após avaliação in natura e após o período de refrigeração e congelamento/descongelamento. Jaboticabal, 2016.

[] mM	In Natura			
	C	TR	NAC	NT
0,35	1,22 $\pm$ 0,35 ^{Aa}	1,08 $\pm$ 0,34 ^{Ab}	1,18 $\pm$ 0,36 ^{Ab}	0,93 $\pm$ 0,24 ^{Aab}
0,25	0,42 $\pm$ 0,19 ^{Ba}	0,22 $\pm$ 0,04 ^{Aa}	0,38 $\pm$ 0,15 ^{Ba}	0,66 $\pm$ 0,22 ^{Ba}
0,15	1,53 $\pm$ 0,21 ^{Aa}	1,64 $\pm$ 0,08 ^{Bb}	1,56 $\pm$ 0,31 ^{Bb}	1,47 $\pm$ 0,13 ^{ABb}
	Refrigerado			
	C	TR	NAC	NT
0,35	0,80 $\pm$ 0,16 ^{Aa}	1,10 $\pm$ 0,22 ^{Ab}	0,82 $\pm$ 0,18 ^{Aab}	0,88 $\pm$ 0,25 ^{Aab}
0,25	0,34 $\pm$ 0,19 ^{Aa}	0,37 $\pm$ 0,16 ^{Aa}	0,36 $\pm$ 0,09 ^{Aa}	0,32 $\pm$ 0,14 ^{Aa}
0,15	1,08 $\pm$ 0,34 ^{Aa}	1,22 $\pm$ 0,31 ^{Bb}	1,17 $\pm$ 0,33 ^{Ab}	1,05 $\pm$ 0,31 ^{Ab}
	Congelado			
	C	TR	NAC	NT
0,35	1,13 $\pm$ 0,80 ^{Aa}	1,38 $\pm$ 0,89 ^{Ab}	1,09 $\pm$ 0,68 ^{Aa}	0,87 $\pm$ 0,89 ^{Aa}
0,25	0,51 $\pm$ 0,23 ^{Aa}	0,50 $\pm$ 0,07 ^{Aa}	0,67 $\pm$ 0,46 ^{Aa}	0,59 $\pm$ 0,25 ^{Aa}
0,15	1,11 $\pm$ 0,46 ^{Aa}	1,98 $\pm$ 0,60 ^{BCb}	2,36 $\pm$ 0,95 ^{Cb}	1,49 $\pm$ 1,23 ^{Bb}

^{AB} Para valores diferentes entre os tratamentos na mesma concentração, na mesma linha $p < 0,05$.

^{ab} Para valores diferentes entre as concentrações no mesmo tratamento, na mesma coluna $p < 0,05$.

6.1.5. Mensuração Total das ROS - TAC

Na quantificação da produção total de ROS, a adição de NAC, Trolox, e ambos associados não diferiram quando mensurados a In Natura ROS ($p > 0,05$) (Tabela 7).

Após 48 horas de refrigeração, a adição dos antioxidantes isolados ou associados nas três concentrações mantiveram menor produção de ROS quando comparadas ao grupo controle que não recebeu antioxidante ($p < 0,05$), destacando-se ainda a associação da NAC com o Trolox na concentração de 0,25mM e de 0,15mM do Trolox isoladamente. Entre as concentrações apenas a adição de 0,25mM de NAC e NT foi mais eficaz do que os mesmos antioxidantes nas concentrações de 0,15 e 0,35mM ($p < 0,05$) (Tabela 7).

Semelhantemente ao observado após o período de refrigeração, ao congelar e descongelar, as amostras acrescidas de 0,35 e 0,25mM de Trolox, NAC e sua associação, mantiveram a produção total das ROS, inferior ao grupo controle ($p < 0,05$). Ademais, a associação dos dois antioxidantes na concentração de 0,25mM foi superior na manutenção da produção das ROS quando comparada ao uso destes antioxidantes de forma isolada ($p < 0,05$). No entanto, a utilização somente de 0,15mM de NAC, ou deste antioxidante acrescido do Trolox, promoveram aumento na produção total de ROS quando comparado ao controle, e ao grupo que recebeu 0,15mM de Trolox ($p < 0,05$) (Tabela 7).

Quando comparada as concentrações de um mesmo antioxidante após a congelação/descongelação a adição de 0,15mM de Trolox, 0,25 e 0,35mM de NAC e de NT foram significativamente superior, na manutenção da produção das ROS comparadas as demais concentrações ($p < 0,05$) (Tabela 7).

Tabela 7. Média $\pm$ desvio padrão da produção das ROS, pelo teste TAC, dos espermatozoides recuperados do epidídimo de cães em meio diluidor sem antioxidante (Controle - C) e acrescido de diferentes concentrações (0,35, 0,25, 0,15mM) de N-acetilcisteína (NAC), Trolox (TR) ou a associação de ambos (NT) após avaliação in natura e após o período de refrigeração e congelação/descongelação. Jaboticabal, 2016.

[] mM	In Natura			
	C	TR	NAC	NT
0,35	0,89 $\pm$ 0,03 ^{Aa}	0,89 $\pm$ 0,05 ^{Aa}	0,89 $\pm$ 0,02 ^{Aa}	0,82 $\pm$ 0,07 ^{Aa}
0,25	0,78 $\pm$ 0,17 ^{Aa}	0,88 $\pm$ 0,02 ^{Aa}	0,88 $\pm$ 0,02 ^{Aa}	0,80 $\pm$ 0,01 ^{Aa}
0,15	0,88 $\pm$ 0,06 ^{Aa}	0,81 $\pm$ 0,19 ^{Aa}	0,88 $\pm$ 0,16 ^{Aa}	0,82 $\pm$ 0,04 ^{Aa}
	Refrigerado			
	C	TR	NAC	NT
0,35	1,02 $\pm$ 0,09 ^{Ba}	0,88 $\pm$ 0,04 ^{Aa}	0,90 $\pm$ 0,01 ^{Ab}	0,80 $\pm$ 0,09 ^{Ab}
0,25	1,07 $\pm$ 0,10 ^{Ca}	0,85 $\pm$ 0,01 ^{Ba}	0,82 $\pm$ 0,11 ^{ABa}	0,70 $\pm$ 0,05 ^{Aa}
0,15	0,99 $\pm$ 0,09 ^{Ca}	0,91 $\pm$ 0,06 ^{Ab}	0,90 $\pm$ 0,03 ^{ABb}	0,99 $\pm$ 0,12 ^{BCc}
	Congelado			
	C	TR	NAC	NT
0,35	0,85 $\pm$ 0,09 ^{Ba}	0,79 $\pm$ 0,02 ^{Ab}	0,77 $\pm$ 0,04 ^{Aa}	0,76 $\pm$ 0,19 ^{Aa}
0,25	0,96 $\pm$ 0,11 ^{Ca}	0,77 $\pm$ 0,06 ^{Ba}	0,77 $\pm$ 0,11 ^{Ba}	0,69 $\pm$ 0,01 ^{Aa}
0,15	0,93 $\pm$ 0,09 ^{Ba}	0,85 $\pm$ 0,18 ^{ABb}	1,02 $\pm$ 0,21 ^{Cb}	1,01 $\pm$ 0,13 ^{Cb}

^{AB} Para valores diferentes entre os tratamentos na mesma concentração, na mesma linha $p < 0,05$.

^{ab} Para valores diferentes entre as concentrações no mesmo tratamento, na mesma coluna $p < 0,05$.

6.1.6. Índice de Atividade Citoquímica - DAB

O índice de atividade citoquímica é quantificado, como anteriormente explicado, pela mensuração da atividade mitocondrial. Quando avaliado a In Natura, a adição de 0,35mM do Trolox associado com a NAC preservou esta atividade quando comparada ao grupo controle e ao Trolox separadamente. Já na concentração de 0,15mM a adição desses antioxidantes associados, e do Trolox isolado foram superiores ao grupo controle. Em contrapartida a adição de 0,25mM dos antioxidantes foi prejudicial na manutenção da atividade mitocondrial ($p < 0,05$) (Tabela 8).

Ainda observando a atividade mitocondrial a In Natura, comparando as concentrações de um mesmo tratamento, destacou-se como as mais eficazes na manutenção desta atividade 0,15mM de Trolox; 0,35mM de NAC; e 0,35 e 0,15mM de NAC com Trolox ($p < 0,05$) (Tabela 8).

Após o período de refrigeração por 48 horas, o Trolox, a NAC e ambos associados, nas três concentrações foram superiores na manutenção da atividade mitocondrial quando comparado ao grupo controle que não recebeu adição de antioxidante ($p < 0,05$). Destacando ainda na concentração de 0,15mM, a NAC foi superior a sua associação com o Trolox. Ao se comparar as diferentes concentrações de Trolox e NT, não foram observadas diferenças significativas entre elas. Já adição de 0,15mM de NAC foi superior a adição de 0,25mM do mesmo antioxidante ($p < 0,05$) (Tabela 8).

Diferenças significativas foram observadas após a congelação/descongelação, onde a adição de 0,35mM de Trolox, foi superior aos demais grupos, e a de 0,35mM de NAC manteve maior o índice de atividade mitocondrial que o grupo controle e o grupo que recebeu adição dos dois antioxidantes na mesma concentração ($p < 0,05$). Já na concentração intermediária (0,25), em ordem crescente de manutenção dessa atividade destacou-se o Trolox, a NAC e por fim a associação de ambos ($p < 0,05$). Ainda, ambos os antioxidantes associados ou não, foram eficazes na preservação do índice citoquímico quando adicionados na concentração de 0,15mM ($p < 0,05$) (Tabela 8).

Em relação às concentrações utilizadas do mesmo antioxidante, observou-se uma superioridade de 0,25mM do Trolox; 0,35 e 0,25mM da NAC; e ainda de 0,25 e 0,15mM da associação de ambos antioxidantes após a congelação/ descongelação ($p < 0,05$) (Tabela 8).

Tabela 8. Média $\pm$ desvio padrão da mensuração do índice de atividade citoquímica, pelo método de coloração de DAB, dos espermatozoides recuperados do epidídimo de cães em meio diluidor sem antioxidante (Controle - C) e acrescido de diferentes concentrações (0,35, 0,25, 0,15mM) de N-acetilcisteína (NAC), Trolox (TR) ou a associação de ambos (NT) após avaliação in natura e após o período de refrigeração e congelação/dcongelação. Jaboticabal, 2016.

[] mM	In Natura			
	C	TR	NAC	NT
0,35	89,2 $\pm$ 2,5 ^{Ba}	90,1 $\pm$ 5,5 ^{Bb}	92,8 $\pm$ 2,5 ^{ABa}	96,4 $\pm$ 0,9 ^{Aa}
0,25	89,8 $\pm$ 3,2 ^{Aa}	87,4 $\pm$ 4,9 ^{ABb}	85,8 $\pm$ 4,9 ^{BCb}	82,0 $\pm$ 1,9 ^{Cb}
0,15	93,5 $\pm$ 3,4 ^{Ba}	95,8 $\pm$ 0,9 ^{Aa}	90,9 $\pm$ 2,0 ^{ABab}	92,0 $\pm$ 2,0 ^{Aba}
	Refrigerado			
	C	TR	NAC	NT
0,35	73,5 $\pm$ 10,6 ^{Ba}	86,5 $\pm$ 2,8 ^{Aa}	86,8 $\pm$ 3,1 ^{Aab}	87,2 $\pm$ 5,7 ^{Aa}
0,25	69,8 $\pm$ 1,8 ^{Ba}	84,6 $\pm$ 3,9 ^{Aa}	83,7 $\pm$ 2,3 ^{Ab}	86,4 $\pm$ 2,6 ^{Aa}
0,15	72,9 $\pm$ 1,5 ^{Ca}	85,4 $\pm$ 1,9 ^{Aba}	89,8 $\pm$ 2,4 ^{Aa}	83,6 $\pm$ 4,1 ^{Ba}
	Congelado			
	C	TR	NAC	NT
0,35	35,7 $\pm$ 3,5 ^{Ca}	52,4 $\pm$ 3,0 ^{Ac}	66,0 $\pm$ 6,5 ^{Ba}	39,2 $\pm$ 1,7 ^{Cb}
0,25	40,5 $\pm$ 5,4 ^{Da}	71,8 $\pm$ 4,8 ^{Aa}	69,1 $\pm$ 6,4 ^{Ba}	61,9 $\pm$ 1,9 ^{Ca}
0,15	29,9 $\pm$ 3,1 ^{Ba}	63,7 $\pm$ 4,1 ^{Ab}	60,9 $\pm$ 2,01 ^{Ab}	63,2 $\pm$ 1,9 ^{Aa}

^{AB} Para valores diferentes entre os tratamentos na mesma concentração, na mesma linha $p < 0,05$.

^{ab} Para valores diferentes entre as concentrações no mesmo tratamento, na mesma coluna $p < 0,05$.

6.2. Correlação entre as análises espermáticas

As correlações apresentadas na tabela 11 são referentes aos resultados encontrados entre os testes funcionais e parâmetros avaliados. Considerando-se alta correlação $r \geq 0,70$.

Tabela 9. Coeficientes de correlação (significância) entre as variáveis: motilidade (MOT); vigor (VIG)); avaliação da integridade de membrana pelo teste hiposmótico (HIPO) e teste de fluorescência (FLUO); avaliação da vitalidade espermática pela coloração eosina (EOS); mensuração do índice de atividade citoquímica pela coloração de DAB (IAC); dos radicais hidroxila (TBARS) e do total de ROS (TAC), de amostras espermáticas oriundas de epidídimo canino, conservadas em meio Tris-gema, suplementado ou não com diferentes concentrações de Trolox e/ou NAC (0,15, 0,25 e 0,35mM), por 48 horas de refrigeração ou após congelamento/ descongelamento. Jaboticabal, 2016.

	MOT	VIG	HIPO	EOS	FLUO	IAC	TBARS	TAC
MOT	-	0,79 *	0,91 *	0,91 *	0,85 *	0,83 *	-0,10 (0,18)	-0,06 (0,40)
VIG	0,79 *	-	0,64 *	0,64 *	0,57 *	0,59 *	-0,03 (0,68)	-0,14 (0,06)
HIPO	0,91 *	0,64 *	-	0,97 *	0,96 *	0,81 *	-0,15 (0,03)	-0,01 (0,89)
EOS	0,91 *	0,64 *	0,97 *	-	0,91 *	0,81 *	-0,15 (0,04)	-0,03 (0,68)
FLUO	0,85 *	0,57 *	0,96 *	0,91 *	-	0,76 *	-0,16 (0,02)	-0,01 (0,98)
IAC	0,83 *	0,59 *	0,81 *	0,81 *	0,76 *	-	-0,02 (0,75)	-0,05 (0,56)
TBARS	-0,10 (0,17)	-0,03 (0,68)	-0,15 (0,03)	-0,15 (0,04)	-0,16 (0,02)	-0,02 (0,75)	-	0,15 (0,04)
TAC	-0,06 (0,40)	-0,14 (0,06)	-0,01 (0,89)	-0,03 (0,68)	-0,01 (0,98)	-0,05 (0,56)	0,15 (0,04)	-

* p<0,0001

6.3. Avaliação da produção das ROS do fluido epididimário

Na mensuração do total de radicais livres do fluido epididimário observou-se média de $1.912 \pm 0,186 \mu\text{M}$ pelo teste TAC e $0,027 \pm 0,006 \text{nM}$ de hidroxilas quantificadas pelo teste TBARS.

6.4. Correlação entre a mensuração de ROS no fluido epididimário e as análises espermáticas

As correlações apresentadas na tabela 12 são referentes aos valores encontrados entre a mensuração de ROS no fluido epididimário e as análises realizadas no recuperado espermático a In Natura, sem adição de antioxidantes. Considerando-se alta correlação $r \geq 0,70$.

Tabela 10. Coeficientes de correlação (significância) entre as variáveis espermáticas: motilidade (MOT); avaliação da integridade de membrana pelo teste hiposmótico (HIPO) e teste de fluorescência (FLUO); avaliação da vitalidade espermática pela coloração eosina (EOS); mensuração do índice de atividade citoquímica pela coloração de DAB (IAC); e a mensuração dos radicais hidroxila (TBARS FE) e do total de ROS (TAC FE) no fluido epididimário. Jaboticabal, 2016.

	MOT	HIPO	EOS	FLUO	IAC	TAC FE	TBARS FE
TAC FE	-0,19 (0,80)	-0,96 (0,03)	-0,11 (0,88)	-0,93 (0,06)	0,89 (0,10)	-	0,99 (0,001)
TBARS FE	-0,13 (0,68)	-0,62 (0,02)	-0,21 (0,47)	-0,50 (0,07)	0,31 (0,29)	0,99 (0,001)	-

7. DISCUSSÃO

No presente estudo, a refrigeração e congelação/descongelação provocaram queda na motilidade e vigor, bem como ocasionou maiores danos na membrana plasmática dos espermatozoides oriundos de epidídimo canino. O efeito deletério da criopreservação na estrutura da membrana plasmática e na função do espermatozoide de mamíferos já foi descrito em diferentes espécies domésticas (HOLT; HEAD; NORTHI, 1992; BAILEY; BILODEAU; CORMIER, 2000; THUWANUT et al, 2008). Em cães, esse efeito também foi relatado após a criopreservação de espermatozoides obtidos a partir do ejaculado (MICHAEL et al, 2007).

O declínio dos parâmetros seminais é resultado da ocorrência de crio-injúrias nas células espermáticas durante o processo de criopreservação (WATSON, 2000). Inúmeros fatores estão envolvidos na ocorrência de danos aos espermatozoides criopreservados, dentre eles, as baixas temperaturas e o aumento da produção de ROS; que por sua vez, podem ser minimizados pelo decréscimo da temperatura de maneira controlada, assim como a utilização de meios específicos (CUNHA, 2002). Acredita-se as espécies reativas de oxigênio sejam responsáveis pelo declínio da qualidade espermática, pois quanto maior a concentração de ROS, menor o percentual de integridade espermática. Dessa forma, no presente estudo foram acrescidas diferentes concentrações de antioxidantes ao meio diluente Tris-gema com intuito de diminuir ou controlar a produção das ROS e minimizar danos.

Concentrações elevadas de espécies reativas de oxigênio, assim como o alto grau de deterioração espermática foram encontradas em amostras de ejaculado canino, após o processo de congelação/descongelação (TSELKAS et al., 2000; MICHAEL et al, 2009). Entretanto, tais achados não foram observados no presente estudo e diferentemente do aumento crescente na produção de ROS relatado por esses autores, a produção de espécies reativas de oxigênio manteve-se inalterada após a criopreservação. Portanto, apesar do grupo controle (meio sem antioxidantes) apresentar maior concentração total das ROS em relação às amostras acrescidas de Trolox e/ou NAC, a adição desses antioxidantes ao meio foi benéfica às células

espermáticas, uma vez que não houve aumento na produção de ROS após a criopreservação.

No presente estudo, após 48 horas de refrigeração, foi observado que o uso individual de Trolox e NAC nas concentrações de 0,15, 0,25 e 0,35mM, assim como a associação de ambos nas concentrações de 0,25mM e 0,35mM apresentaram maior eficácia na manutenção da produção total de radicais livres, quando comparados ao grupo controle. Da mesma forma, pôde-se observar que após o período de congelação/descongelação, os antioxidantes utilizados juntos ou isoladamente foram benéficos na manutenção da produção das ROS nas concentrações de 0,25 e 0,35mM, todavia a adição de 0,15mM de NAC e esta associada ao Trolox, aumentaram a produção total de ROS neste período. Destarte, pode-se afirmar que o uso isolado do Trolox e da NAC, nas concentrações de 0,25 e 0,35mM foram suficientes para impedir a formação de ROS, ou ainda neutralizá-las após sua produção.

Desconhece-se estudos prévios sobre a associação desses dois antioxidantes. Deste modo, acredita-se que a adição de ambos na concentração de 0,15mM tenha sido insuficiente para a manutenção da formação das ROS, uma vez que na concentração de 0,25mM esta associação, mostrou-se extremamente eficaz na manutenção da produção das ROS, assim como na viabilidade espermática. Este fato nos levou a crer que uma concentração maior seria ainda melhor. Assim, a adição dos antioxidantes associados na concentração de 0,35mM, apesar de manter em níveis mais baixos a produção das ROS, quando comparado ao controle, esta não foi capaz de manter a viabilidade espermática. Dessa forma, pode-se afirmar que existe uma linha tênue entre a concentração ideal e a concentração deletéria de antioxidante, uma vez que pequenos acréscimos podem causar danos irreparáveis à função espermática.

As espécies reativas de oxigênio, são classificadas em: radicais superóxido (O_2^-); radical hidroxila ($OH^\cdot$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (COHEN, 1989). Semelhantemente ao descrito por Michael e colaboradores (2009), no presente estudo não foram constatadas alterações na produção exclusiva do radical hidroxila ($OH^\cdot$) nos grupos que receberam à adição dos diferentes antioxidantes na concentração de 0,35mM em relação ao grupo controle. Acredita-se que este resultado tem origem no

método utilizado para a mensuração do radical $\text{OH}^\cdot$, que quantifica a produção total de hidroxilas no meio externo a células, e de certa forma, desconsidera o fato de que esse radical é gerado intracelularmente e possui vida útil muito limitada por reagir rapidamente com moléculas biológicas (GRIVEAU LANNOU; LE, 1997).

Além disso, o meio Tris-gema é considerado um potente removedor de $\text{OH}^\cdot$ (CHATTERJEE; GAGNON, 2001) devido a atividade da catalase observada na gema do ovo (DESJARDINS; HAFS, 1961). Essa característica provavelmente impediu a ocorrência de alterações significativas entre os meios acrescidos de antioxidantes, na concentração de 0,35mM e no grupo controle.

O presente estudo comprovou que a adição de antioxidantes no meio diluidor manteve a qualidade espermática durante 48 horas de refrigeração e após a descongelação. Em particular, a inclusão de 0,15mM de Trolox ao meio diluidor após 48 horas de refrigeração impediu o declínio dos parâmetros espermáticos, mantendo 37% de motilidade, 18% de vigor, 34% de integridade de membrana e 38% de células vivas a mais quando comparada ao grupo controle. Tais achados corroboram com os resultados obtidos em estudos utilizando a adição de 0,1mMol de vitamina E ao ejaculado canino (MICHAEL et al, 2009), de cervídeos (DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO et al, 2009), e de suínos (PEÑA et al, 2003) após refrigeração.

Ainda observando o efeito do Trolox, pode-se constatar que a adição deste antioxidante nas três concentrações estudadas possui efeito positivo na manutenção espermática durante o processo de congelação/descongelação ($p < 0,05$). Resultados semelhantes aos nossos foram observados em estudo utilizando a adição de 0,3mMol de vitamina E ao meio diluidor do ejaculado canino (MICHAEL et al, 2007).

Acredita-se que a preservação das células espermáticas, tanto após o período de refrigeração quanto após a descongelação mencionadas acima, se deve ao fato do Trolox atuar igualmente a vitamina E, ou seja, rompendo a reação de lipoperoxidação, removendo os radicais peroxil e impedindo a propagação dessa reação (BENDICH, 1990; SILVA; GADELLA 2006). Contudo, o radical peroxil está envolvido na capacidade de aquisição de velocidade espermática, sendo assim, uma quantidade mínima desse radical é necessária para manutenção da motilidade (LOPES, 2010). Dessa forma, acreditamos que a suplementação com Trolox nas concentrações 0,25 e 0,35mM, removeu em excesso os radicais peroxil, uma vez que

ao se comparar os valores de motilidade ao grupo de 0,15mM, pode-se constatar uma redução na motilidade espermática nesses grupos após 48 horas de refrigeração. Sendo assim, pode-se concluir que a concentração mínima de Trolox adicionada ao meio diluidor foi ideal para impedir o desequilíbrio da produção desse radical, e consequentemente manter maior motilidade e porcentagem de células espermáticas com membranas íntegras após o processo de congelamento/descongelamento.

Em relação à N-acetilcisteína, estudos prévios descrevem, que altas concentrações da NAC (2,5mM, 5mM) possuem efeito deletério aos espermatozoides caninos, uma vez que, diminuem sua viabilidade após a criopreservação. Em contrapartida, uma baixa concentração (0,5mM) de NAC é capaz de promover maior proteção à célula espermática contra injúrias resultantes do processo de criopreservação. (MICHAEL et al, 2010; SAVI, 2012).

Visando resultados superiores, no presente estudo, optou-se pela utilização de concentrações menores que 0,5mM e pôde-se observar que a adição de 0,35mMol deste antioxidante ao meio diluidor foi 19% e 54% mais eficaz na manutenção da motilidade quando comparado a mesma concentração de Trolox e ao meio controle, respectivamente. Ao avaliar a manutenção do vigor na mesma concentração (0,35mM), a NAC foi superior a todos os outros tratamentos e ao grupo controle após 48 horas de refrigeração; todavia, em relação à integridade de membrana, destacamos uma diferença significativa somente em relação ao grupo controle.

Semelhantemente ao nosso estudo, Michael e colaboradores (2007) utilizaram 0,3mM de NAC no meio diluidor durante a criopreservação de espermatozoides oriundos do ejaculado canino e observaram um efeito positivo sobre a motilidade e viabilidade espermática quando comparado ao grupo controle (sem antioxidante) após a descongelamento. Informações similares foram constatadas no presente estudo, observando maior manutenção da motilidade, vigor, integridade de membrana e vitalidade das células espermáticas oriundas de epidídimo canino.

Supõe-se que a NAC possa ter protegido as células espermáticas após a refrigeração ou descongelamento de forma indireta, sem eliminar completamente a produção das ROS, pois é sabido que a NAC atua como precursor da cisteína, estimulando enzimas citosólicas intracelulares a participar do metabolismo da glutatona, reparando, assim, danos ocasionados ao DNA (COCCO et al, 2005). Além

disso, devido à similaridade de sua estrutura química, ela tem um efeito antioxidante semelhante à glutathione (MICHAEL et al, 2010).

Em alguns pontos neste estudo pode-se observar superioridade de um antioxidante em relação ao outro. A suplementação com 0,35mMol de NAC apresentou resultados mais satisfatórios em relação à mesma concentração de Trolox na manutenção da viabilidade espermática após a refrigeração e congelamento/descongelamento. Entretanto, foram observados resultados antagônicos quando os antioxidantes foram adicionados na concentração de 0,15mMol e refrigerados por 48 horas.

Conhece-se que esses dois antioxidantes atuam de formas diferentes (COCCO et al., 2005; SILVA; GADELLA, 2006), e por este fato, acredita-se que cada um possui uma concentração ideal para ser adicionado ao meio diluidor. Deste modo, supõe-se que devido a forma de atuação distinta, a associação destes é sinérgica. Essa afirmação pode ser comprovada após a refrigeração por 48 horas das células espermáticas epididimárias caninas, onde amostras suplementadas com 0,25mM de NAC e 0,25mM de Trolox, apresentaram melhores resultados quanto a viabilidade espermática, quando comparados à amostras que receberam a mesma concentração destes antioxidantes de forma isolada.

Em relação a atividade mitocondrial foi demonstrado neste estudo que ambos antioxidantes, associados ou isolados, preservaram esta atividade nas células espermáticas, quando comparado ao grupo controle após a refrigeração ou congelamento/descongelamento. Sabe-se que não há perda do potencial mitocondrial, mesmo que haja aumento da produção de radicais livres (KOOPERS et al, 2011). Esta afirmação, justifica a manutenção da atividade mitocondrial neste estudo, mesmo com o aumento da produção de ROS, além disso como as mitocôndrias são responsáveis pela formação de ATP, e durante esse processo ocorre a liberação de ROS, a atividade mitocondrial está relacionada com a produção desses radicais.

Mais uma vez afirmamos a necessidade de estudos espécie específicos dos antioxidantes, pois Borges (2008), constatou que a adição de 0,2mM de Trolox ao sêmen bovino, não sustentou a atividade mitocondrial das células espermáticas após a descongelamento. Contrariamente quando adicionado aos espermatozoides oriundos de epidídimo canino o Trolox nas concentrações de 0,15mMol, 0,25mMol e 0,35mMol

mantiveram esta atividade 106%, 77% e 67% maior do que o grupo controle que não recebeu adição de antioxidante.

Acreditamos que devido a preservação da atividade mitocondrial, observada nesse estudo, a motilidade espermática foi conservada, pois o movimento flagelar responsável pela motilidade é dependente da utilização do ATP produzido pelas mitocôndrias presentes na peça intermediária (AITKEN, 1998).

Kramer e colaboradores (1993) comprovaram a existência da relação entre a atividade mitocondrial e a integridade de membrana com a capacidade de fecundação, as afirmações anteriores podem ser justificadas neste estudo pelo alto valor da correlação constatada, entre o índice de atividade mitocondrial e motilidade ($r=0,83$) e entre este índice e a integridade de membrana e vitalidade ($r=0,81$).

Os resultados do presente trabalho reafirmam os achados descritos por Brito e colaboradores (2003), sendo que ambos descreveram correlação positiva entre o teste hiposmótico e eosina ($r= 0,97$; $r=0,55$); hiposmótico e fluorescência ($r=0,95$; $r=0,59$); entre eosina e fluorescência ($r=0,90$; $r=0,92$), respectivamente. Ainda, o presente estudo corrobora com Zuccari e colaboradores (2009), quanto a presença de correlação positiva entre a motilidade e o número de células com membrana íntegra após os testes hiposmótico e de fluorescência ($r=0,90$ e $r=0,85$), respectivamente. A reprodução animal, deve sempre ser vista como um todo, apenas um teste não é capaz de dizer se a célula espermática é apta a fecundar um oócito, deste modo a correlação positiva entre os testes facilita o trabalho a campo, permitindo acreditar que se houver a possibilidade de realização de poucos testes, a escolha dos que possuem alta correlação com outras análises impõe maior segurança em relação aos resultados.

Neste estudo também foi observado correlação positiva entre a quantidade total de radicais livres mensurados encontrados no fluido epididimário, com o índice de atividade mitocondrial ($r=0,89$). As mitocôndrias são responsáveis pela formação de ATP e durante esta reação há uma alta produção de ROS (AITKEN, 1998). Desse modo, quanto maior a atividade mitocondrial, maior quantidade de ROS deve ser encontrada no fluido epididimário e consequentemente menor o número de espermatozoides viáveis, uma vez que estas duas variáveis apresentam alta correlação negativa com a integridade de membrana, conforme citado anteriormente.

No presente estudo, observou-se correlação negativa em relação ao total de ROS encontrado no fluido epididimário e os testes hiposmótico e de fluorescência que avaliam a integridade de membrana ($r=-0,96$ e $r=-0,93$).

Assim, observamos que os valores de radicais livres encontrados no fluido epididimário, provém de células viáveis, que possuem alto índice de atividade mitocondrial, resultando em grande produção de ATP, com isso ocorre continua liberação de ROS, que ocasionariam lesão de membrana nas células espermáticas, porém neste estudo essa injúria foi amenizada pelos antioxidantes adicionados.

Por fim, acredita-se que as baixas concentrações de antioxidantes estudadas são eficientes para manutenção da viabilidade espermática. Contudo, devido à escassez de estudos na área, afirma-se ser necessária a realização de novas pesquisas para comprovar qual a melhor dose e o melhor antioxidante associado ou não para a criopreservação de células espermáticas caninas.

8. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos e os objetivos previamente delineados concluiu-se que:

- Todos os antioxidantes associados ou não, atuaram preservando as células espermáticas após 48 horas de refrigeração, com destaque para as concentrações de 0,15mM de Trolox; 0,25mM de NAC e Trolox e 0,35mM de NAC.
- O Trolox e a NAC juntos ou isolados, conferiram maior manutenção dos espermatozoides após o processo de congelação/descongelação nas concentrações 0,25 e 0,35mM.
- A adição do Trolox e/ou da NAC ao meio diluente Tris-gema, diminuiu a produção total de ROS, porém não atuaram isoladamente na manutenção dos índices de hidroxila.
- Há correlação entre a quantidade de ROS observada no fluido epididimário e a viabilidade espermática.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R.K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.3, p.28, 2005.
- AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction Fertility Development**, v.7, p.659–668, 1995.
- AITKEN, R.J. Molecular mechanisms regulating human sperm function. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, p.169–173, 1998.
- AITKEN, R.J.; CURRY, B.J. Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.14, p.367–381, 2011.
- AITKEN, R.J.; DE IULIIS, G.N. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v.16, p.3–13, 2010.
- AITKEN, R.J.; WEST, K.; BUCKINGHAM, D. Leukocytic infiltration into the human ejaculate and its association with semen quality, oxidative stress, and sperm function. **Journal of Andrology**, v.15, p.343–352, 1994.
- ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, Amsterdam, v.350, n.1, p.103-108, 1996.
- BAILEY, J.L.; BILODEAU, J.F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 1-7, 2000.
- BALL, B.A.; MEDINA, V.; GRAVANCE, C.G.; BAUMBE, J. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 degrees C. **Theriogenology**, v.56, p.577–589, 2001.
- BARGMANN, W.V. **Histología y anatomía microscópicas humanas**. Barcelona: Labor, p. 68-75. 1968.
- BARJA, G. Mitochondrial oxygen consumption and reactive oxygen species production are independently modulated: implications for aging studies. **Rejuvenation Research**, v.10, p.215-223, 2007.

- BAUST J.G. The management of mammalian cells at low temperature. **Cell Preservation Technology**. v.6, n.2, p.111-112, 2008
- BECCAGLIA M., ANASTASI P., CHIGIONI S., Tris-lecithin extender supplemented with antioxidant catalase for chilling of canine semen. Paper presented at the 6th International Symposium on Canine and Feline Reproduction & 6th Biennial **EVSSAR** Congress, Vienna, Austria, 2008.
- BENDICH A. Antioxidant Micronutrients and Immune Responses. **Annals New York Academy of Sciences**, p. 168-180, 1990.
- BIANCHI, M.L.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição de Campinas**, v.12, n.2, p.123-130, 1999.
- BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; GAGNON, C.; SIRARD, M.A. Thiols prevent H₂O₂- mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen, **Theriogenology**, v.56, p.275–286, 2001.
- BLIER, P.U.; DUFRESNE, F.; BURTON, R.S. Natural selection and the evolution of mtDNA-encoded peptides: evidence for intergenomic co-adaptation. **Trends in Genetics**, v.17, p. 400-406, 2001.
- BORGES, J.C., Efeito da utilização de antioxidante no diluidor para a criopreservação de sêmen bovino avaliado através de testes complementares, inseminação artificial e fecundação *in vitro*. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. **Tese** (Doutorado), Jaboticabal, São Paulo, 2008.
- BRITO, L.F.C. Evaluation of stallion sperm morphology. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v.6, p.249-264, 2007. .
- BRITO, L.F.C.; BARTH, A.D.; BILODEAU – GOESSELS, S.; PANICH, P.L; KASTELIC, J.P. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with *in vitro* fertilization rate. **Theriogenology**, v.60, p.1539-1551, 2003.
- BUCAK, M.N.; ATESSAHIN, A.; VARISLI, O.; YUCE, A.; TEKIN, N.; AKCAY, A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen. Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process, **Theriogenology**, v.67, p.1060–1067, 2007.

- CABALLERO, J.; FRENETTE; SULLIVAN, R. Post testicular sperm maturational changes in the bull: important role of the epididymosomes and prostasomes. **Veterinary Medicine International**, ID 757194. 2011.
- CASSANI, P.; MARTHA, T.; BECONI, CRISTIAN O'FLAHERTY. Relationship between total superoxide dismutase activity with lipid peroxidation, dynamics and morphological parameters in canine semen. **Animal Reproduction Science**, v.86, p.163–173, 2005.
- CBRA, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal, 2ed, Belo Horizonte, **CBRA**, 1998.
- CEROLINI, S.; KELSO, K.A.; NOBLE, R.C.; SPEAKE, B.K.; PIZZI, F.; CAVALCHINI, L.G. Relationship between spermatozoan lipid composition and fertility during aging of chickens. **Biology of Reproduction**, v.57, p.976–980, 1997.
- CHATTERJEE, S.; GAGNON, C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v.59, p.452-458, 2001.
- COCCO, T., SGOBBO, P., CLEMENTE, M., LOPRIORE, B., GRATAGLIANO, I., DI PAOLA, M., VILLANI, G., Tissue-specific changes of mitochondrial functions in aged rats: effect of a long-term dietary treatment with N-acetylcysteine. **Free Radical Biological Medicine**, v.38, p.796–805, 2005.
- COHEN MV. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? **Ann International Medicine**; v.111, p.918-931, 1989.
- COLLIN, S.; BAILEY, J.L. Assessment of intracellular calcium levels in cryopreserved bovine sperm by flow cytometry. **Theriogenology**, v.51, p.341, 1999.
- CONTRI, A.; GLORIA, A.; ROBBE, D.; DE AMICIS, I.; CARLUCCIO, A. Characteristics of donkey spermatozoa along the length of the epididymis. **Theriogenology**, v.77, p.166–173, 2012.
- COOPER, T.G. The epididymis, cytoplasmic droplets and male fertility. **Asian Journal of Andrology**, v.13, p.130–138, 2011.
- CORREA, J.R.; ZAVOS, P.M. The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. **Theriogenology**, v.42, p.351-360, 1994.

- CUNHA, I.C.N. Criopreservação do sêmen de cães. Botucatu, **Tese** (doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. 59p. 2002.
- CUNHA, I.C.N.; LOPES, M.D.; ZUCCARI, C.E.S.N. Padronização da técnica fluorescente para avaliação da integridade de membranas espermáticas na espécie canina. In: **Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias**, 15, 1996, Campo Grande. Proceedings... Mato Grosso: Brasil, p.411. 1996.
- DESJARDINS, C. & HAFS, H.D. Enzymatic degradation of hydrogen peroxide in egg yolk. **Journal of Dairy Science**, v. 44, p. 1183, 1961
- DE LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v.2, p.48 –54, 1997.
- DE VRIES, N.; DE FLORA, S. N-Acetyl-l-cysteine. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.17F (suppl.), p. 270-277; 1993.
- DOMINGUEZ-REBOLLEDO, A.E.; FERNANDEZ-SANTOS, M.R.; GARCIA-ALVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; GARDE, J.J.; MARTINEZ-PASTOR, F. Washing increases the susceptibility to exogenous oxidative stress in red deer spermatozoa. **Theriogenology**, v.72, p.1073–1084, 2009.
- DOWLING, D.K.; SIMMONS, L.W. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v.276, p.1737-1745, 2009.
- ENGLAND, G.C.W.; PONZIO, P. Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. **Theriogenology** 46, pg 165-171, 1996.
- ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of dog semen: a review. **Journal Reproduction Fertility**. v.47, n.202, p.243-255, 1993.
- FARSTAD, W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. **Animal Reproduction Science**, v.60/61, p.375-387, 2000.
- FERNANDEZ-SANTOS, M.R.; MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCIA-MACIAS, V.; ESTESO, M.C.; SOLER, A.J.; PAZ, P.; ANEL, L.; GARDE, J.J.; Sperm characteristics and DNA integrity of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa frozen in the presence of enzymatic and nonenzymatic antioxidants. **Journal of Andrology**, v.28, p.294–305, 2007.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, p.1-16, 1997.

FOUCHECOURT, S.; METAYER, S.; LOCATELLI, A.; DACHEUX, F.; DACHEUX, J.L. Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. **Biology of Reproduction**, v.62, p.1790–1803, 2000.

GAÑÁN, N.M.; GOMENDIO, M.; ROLDAN, E.R.S. Effect of storage of domestic cat (*felis catus*) epididymides at 5°C on sperm quality and cryopreservation. **Theriogenology**, v.72, p.1268-1277, 2009.

GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.H.C. Papel de oxidantes e antioxidantes na andrologia (Revisão de Literatura). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.28, p.187–195, 2004.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, New York, v.52, n.8, p.253-265, 1994.

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

HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to asses membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal Reproduction Fertility**, v.88, p.343-352, 1990.

HEISE, A.; KÄHN, W.; VOLKMANN, D.H.; THOMPSON, P.N.; GERBER, D. Influence of seminal plasma on fertility of fresh and frozen-thawed stallion epididymal spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.118, p.48-53, 2010.

HELLER, R.; HECKER, M.; STAHMANN, N.; THIELE, J.J.; WERNER-FELMAYER, G.; WERNER, E.R. Alpha-tocopherol amplifies phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase at serine 1177 and its short-chain derivative trolox stabilizes tetrahydrobiopterin. **Free Radical Biology & Medicine**, v.37, p. 620-631, 2004.

HERRERA, C.; MIRAGAYA, H.M.; CONDE, P.; HYNES, V.; LOSINNO, L.; QUINTANS, C.; PASQUALINI, R.S. Intracytoplasmic injection of in vitro-matured equine oocytes with frozen-thawed epididymal sperm. **Animal Reproduction Science**, v.94, p.299-302, 2006.

- HEWITT, D.A.; LEAHY, R.; SHELDON, I.M.; ENGLAND, G.C. Cryopreservation of epididymal dog sperm. **Animal Reproduction Science**, v.67, p.101-111, 2001.
- HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.3–22, 2000.
- HOLT, W.V.; HEAD, M.F.; NORTH, R.D. Freeze-induced membrane damage in ram spermatozoa is manifested after thawing - observation with experimental cryomicroscopy. **Biology of Reproduction**, v.46, p.1086-1094, 1992.
- HORI, T.; HAGIUDA, K.; ENDO, S.; HAYAMA, A.; KAWAKAMI, E.; TSUTSUI, T. Unilateral intrauterine insemination with cryopreserved caudal epididymal sperm recovered from refrigerated canine epididymidys. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v.67, p.1141-1147, 2005.
- HORI, T.; ICHIKAWA, M.; KAWAKAMI, E.; TSUTSUI, T. Artificial insemination of frozen epididymal sperm in beagles dogs. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.66, p.37–41, 2004.
- HORI, T.; MATSUDA, Y.; KOBAYASHI, M.; KAWAKAMI, E.; TSUTSUI, T. Comparison of fertility on intrauterine insemination between cryopreserved ejaculated and cauda epididymal sperm in dogs. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v.73, p.1685–8, 2011.
- HRUDKA F., Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. **International Journal Andrology**, v.11, n.5, p.457-458, 1987.
- JANUSKAUSKAS, A.; GIL, J.; SÖDERQUIST, L.; RODRIGUEZMARTINEZ, H. Relationship between sperm response to glycosaminoglycans in vitro and non-return rates of Swedish dairy AI bulls. **Reproduction in Domestic Animal**, v.35, p.207-212, 2000.
- JERVIS, K.M.; ROBAIRE, B. Dynamic changes in gene expression along the rat epididymis. **Biology of Reproduction**, v.65, p.696-703, 2001.
- JEYEDRAN, R. S.; VAN DER VEN, H. H.; PEREZ-PELAEZ, M., Development of an assay to assess the functional integrity of human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, Colchester, v.70, n.1, p.219-228, 1984.

- JIMÉNEZ, E.; PÉREZ-MARÍN, C.C.; VIZUETE, G.; MILLÁN, Y.; AGÜERA, E.I. Effect of Different Extenders on In Vitro Characteristics of Feline Epididymal Sperm During Cryopreservation, **Reproduction Domestic Animal**, v.48, p.665–672, 2013.
- JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OSLON, P.N.S. Semen collection, evaluation and preservation. In: Johnston SD, Kustritz MVR, Oslon PNS. **Canine and feline theriogenology**. Philadelphia: WB Saunders, p.287-306, 2001.
- KAWAKAMI, E.; VANDEVOORT, C.A.; MAHI-BROWN, C.A.; OVERSTREET, J.W. Induction of acrosome reaction of canine sperm by homologous zona pellucida. **Biology of Reproduction**, v.48, p.841-845, 1993.
- KLINC, P.; MAJDIC, G.; STERBENC, N.; CEBULJ-KADUNC, N.; BUTINAR, J.; KOSEC, M. Establishment of a pregnancy following intravaginal insemination with epididymal semen from a dog castrated due to benign prostatic hyperplasia. **Reproduction Domestic Animal**, v.40, p.559-561, 2005.
- KODAMA, H.; KURIBAYASHI, Y.; GAGNON, C. Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. **Journal of Andrology**. v.17, p.151-157, 1996.
- KOPPERS, A.J.; MITCHELL, L.A.; WANG, P.; LIN, M.; AITKEN, R.J. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathway involvement in a truncated apoptotic cascade associated with motility loss and oxidative DNA damage in human spermatozoa. **Biochemical Journal**, v.436, p.687–698, 2011.
- KOROCHKINA, E.; JOHANNISSON, A.; GOODLA, L.; MORRELL, J.M.; AXNER, E. Effect of prostatic fluid on the quality of fresh and frozenthawed canine epididymal spermatozoa, **Theriogenology**, v.82, p.1206–1211, 2014.
- KRAUSZ, C.; MILLS, C.; ROGERS, S.; TAN, S.L.; AITKEN, R.J. Stimulation of oxidant generation by human sperm suspensions using phorbol esters and formyl peptides: relationships with motility and fertilization in vitro. **Fertility and Sterility**, v.62, p.599–605, 1994.
- LARSSON, B.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Can we use *in vitro* fertilization tests to predict semen fertility? **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.327-336, 2000.
- LENZI, A.; PICARDO, M.; GANDINI, L.; DONDERO, F. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. **Human Reproduction Update**, v.2, p.246–256, 1996.

- LIU, W.M.; PANG, R.T.; CHIU, P.C.; WONG, B.P.; LAO, K.; LEE, K.F.; YEUNG, W.S. Sperm-borne microRNA-34c is required for the first cleavage division in mouse. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.109, p.490–494, 2012.
- LOPES, B.V., Efeito da adição e/ou suplementação de antioxidante no processo de congelação/descongelação de semen de cães férteis e subférteis. **Tese** (doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, 2010.
- LUVONI, G.C.; RUGGIERO, C.; MARINONI, G.; KALCHSCHMIDT, E. Effect of taurine containing diluent for cryopreservation of domestic cat epididymal sperm. **Theriogenology**, v.57, p.466, 2003.
- MACLEOD, J. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. **American Journal of Physiology**, v.138, p.512–518, 1943.
- MAGNES, L.J.; LI, T.K. Isolation and properties of superoxide dismutase from bovine spermatozoa, **Biology of Reproduction**, v.22, p.965–969, 1980.
- MAIA, M.S. Viabilidade espermática e geração de metabólitos Reativos do Oxigênio (ROS) no semen ovino criopreservado em diluidor aditivado de Lauril Sulfato de Sódio (OEP), Trolox-C e Catalase. **Tese** (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006.
- MALO, C.; GIL, L.; CANO, R.; MARTÍNEZ, F.; GALÉ, I. Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on boar epididymal spermatozoa during cryopreservation. **Theriogenology**, v.75, p.1735–1741, 2011.
- MARKS, S.L.; DUPUIS, J.; MICKELSEN, W.D.; MEMON, M.A.; PLATZ, C.C. Conception by use of postmortem epididymal semen extraction in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.204, p.1639–40, 1994.
- MARTINEZ-PASTOR, F.; FERNANDEZ-SANTOS, M.R.; DEL OLMO, E.; DOMINGUEZ- REBOLLEDO, A.E.; ESTESO, M.C.; MONTORO, V.; GARDE, J.J. Mitochondrial activity and forward scatter vary in necrotic, apoptotic and membrane-intact spermatozoan subpopulations. **Reproduction Fertility and Development**, v.20, p.547–556, 2008.
- MARTINS, M.I.; PADILHA, L.C.; SOUZA, F.F.; LOPES, M.D. Fertilizing capacity of frozen epididymal sperm collected from dogs. **Reproduction Domestic Animal**, v.44(Suppl. 2), p.342–344, 2009.

- MARTINS, M.I.M.; JUSTINO, R.C.; SANT'ANNA, M.C.; TRAUTWEIN, L.G.C.; SOUZA, F.F. Comparison of Two Different Extenders for Cryopreservation of Epididymal Dog Sperm, **Reproduction Domestic Animal**, v.47 (Suppl. 6), p.293–294, 2012.
- MICHAEL, A.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.; SARATSIS, P.; BOSCOS, C. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa, **Theriogenology**, v.68, p.204–212, 2007.
- MICHAEL, A.J.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E.A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.J.; SARATSIS, P.; VERVERIDIS, H.N.; BOSCOS, C.M. Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa, **Animal Reproduction Science**, 112, 119-135, 2009.
- MICHAEL, A.J.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E.A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.J.; SARATSIS, P.; VERVERIDIS, H.N.; BOSCOS, C.M., Effect of N-acetyl-L-cysteine supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa, **Reproduction Domestic Animal**, v.45, p.201-207, 2010.
- MICKLE, D.A.; WEISEL, R.D. Future directions of vitamin E and its analogues in minimizing myocardial ischemia-reperfusion injury and its analogues in minimizing myocardial ischemia-reperfusion injury. **Canadian Journal of Cardiology**, v.9, p.89–93, 1993.
- MONTEIRO, J. C., GONCALVES, J. S., RODRIGUES, J. A., LUCIO, C. F., SILVA, L. C. & ASSUMPCAO, M.E. Influence of ascorbic acid and glutathione antioxidants on frozen-thawed canine semen. **Reproduction Domestic Animal**, v.44, n.2, p.359-362, 2009.
- MORETTI, E.; CASTELLINI, C.; MOURVAKI, E.; CAPITANI, S.; GEMINIANI, M.; MORTIMER, S.T.; MAXWELL, W.M.C. Effect of medium on the kinematics of frozen-thawed ram spermatozoa. **Reproduction** v.127, p.285–291, 2004.
- MURADÁS, P.R.; WEISS, R.R.; KOZICKI, L.E.; GRANEMANN, L.C.; SANTOS, I.W.; PIMPÃO, C.T. Alguns parâmetros de viabilidade de espermatozoides equinos colhidos por vagina artificial e por lavagem da cauda do epidídimo. **Archives of Veterinary Science**, v.11, p.69-74, 2006.

- NORDBERG, J.; ÁRNER, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v.31, p.1287-1312, 2001.
- NOTHLING, J.O.; GERBER, D.; COLENBRANDER, B.; DIJKSTRA, M.; BAKKER, T.; DE CRAMER, K. The effect of homologous prostatic fluid on motility and morphology of dog epididymal spermatozoa extended and frozen in Biladyl with Equex STM paste or Andromed. **Theriogenology**, v.67, p.264–75, 2007.
- O'FLAHERTY, C.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C.; Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. **Free Radical Biology & Medicine**, v.41, p.528–540, 2006.
- OLIVA, S.U.; RINALDO, P.A.; STUMPP, T. Biologia epididimária: Maturação espermática e expressão gênica. **O Mundo da Saúde**, v.33, p.419-425, 2009.
- PAPA, F.O.; MELO, C.M.; FIORATTI, E.G.; DELL'AQUA JR, J.A.; ZAHN, F.S.; ALVARENGA, M.A. Freezing of stallion epididymal sperm. **Animal Reproduction Science**, v.107, p.293-301, 2008.
- PAYÁ M.; HALLIWELL B.; HOULT J.R., Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species. Scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals, **Biochemic Pharmacology**, Jul 22; v. 44, n. 2, p. 205-214, 1992.
- PEÑA, A. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. **Animal Reproduction Science**, v.82–83, p.209–224, 2004.
- PEÑA, A.; LINDE-FORSBERG, C., Effects of equex, one or two step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. **Theriogenology**, v.54, p.859-875, 2000.
- PEÑA, F.J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRIGUEZ MARTINEZ, H.; Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.85–98, 2003.
- PEÑA, F.J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRIGUEZ MARTINEZ, H. Antioxidant supplementation of boar spermatozoa from different fractions of the ejaculate improves cryopreservation: changes in sperm membrane lipid architecture. **Zygote**, v.12, p.117–124, 2004.

- PEÑA, F.J.; MACÍAS GARCÍA, B.; SAMPER, J.C.; APARICIO, I.M.; TAPIA, J.A.; ORTEGA FERRUSOLA, C. Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: The way to improve current cryopreservation protocols? **Theriogenology**, v.76, p.1177–1186, 2011.
- PEREZ, L.J.; VALCÁRCEL, A.; HERAS, M.A.; BALDASSARRE, H. Comparative study of four techniques for evaluation of sperm quality in ovine and bovine frozen-thawed samples. **Reproduction in Domestic Animal**, v.32, p.157-160, 1997.
- PERIS, S.I.; BILODEAU, J.F.; DUFOUR, M.; BAILEY, J.L. Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. **Molecular Reproduction and Development**, v.74, p.878–892, 2007.
- PINTADO, B.; FUENTE, J.; ROLDAN, E.R.S. Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.118, p.145-152, 2000.
- PIRIE, N.W.; HELE, T.S. CCXXXIII. Studies in the sulphur metabolism of the dog. XII. The preparation and metabolism of d- Acetylcysteine. **Biocitem**, p. 1716-1718, 1933.
- PONGLOWHAPAN, S.; CHATDARONG, K. Effects of Equex STM paste on the quality of frozen-thawed epididymal dog spermatozoa. **Theriogenology**, v.69, p.666–72, 2008.
- PONGLOWHAPAN, S.; CHATDARONG, K.; SIRIVAIIDYAPONG, S.; LOHACHIT C. Freezing of epididymal spermatozoa from dogs after cool storage for 2 or 4 days. **Theriogenology**, v.66, p.1633–6, 2006.
- PONGLOWHAPAN, S.; GUSTAVSSON, B., LINDE-FORSBERG, C. Influence of glucose and fructose in the extender during longterm storage of chilled canine semen. **Theriogenology**, v.62, p.1498–1517, 2004.
- PONS-REJRAJI, H.; SION, B.; SAEZ, F.; BRUGNON, F.; JANNY, L.; GRIZARD G. Role of reactive oxygen species (ROS) on human spermatozoa and male infertility. **Gynécologie Obstétrique & Fertilité**, v.37, p.529 –35, 2009.
- POPE, C.E.; ZHANG, Y.Z.; DRESSER, B.L. A simple staining method for evaluating acrossosomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo Wildlife Medicine**, v.22, p.87-95, 1991.

- PUKAZHENTHI, B.; NOILES, E.; PELICAN, K.; DONOGHUE, A.; WILDT, D.; HOWARD, J.G. Osmotic effects on feline spermatozoa from normospermic versus teratospermic donors. **Cryobiology**, v.40, p.139–150, 2000.
- PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v.63, p.215–225, 2006.
- RAMAMOHANA, R.A.O.A.; BANE, A.; GUSTAFSSON, B.K. Changes in the morphology of spermatozoa during their passage through the genital tract in dairy bulls with normal and impaired spermatogenesis. **Theriogenology**, v.14, p.1-12, 1980.
- RICE, A.; PARRINGTON, J.; JONES, K.T.; SWANN, K. Mammalian sperm contain a Ca^{2+} -sensitive phospholipase C activity that can generate $\text{InsP}(3)$ from $\text{PIP}(2)$ associated with intracellular organelles. **Developmental Biology** v.228, p.125–135, 2000.
- ROBAIRE, B.; HINTON, B.T.; ORGEBIN-CRIST, M.C. In Knobil and Neill's Physiology of Reproduction: **The Epididymis**. San Diego: Elsevier/Academic Press: 3rd edition. Edited by Neill JD; p.1071–1148, 2006.
- ROBERTSON, S.A.; GUERIN, L.R.; MOLDENHAUER, L.M.; HAYBALL, J.D. Activating T regulatory cells for tolerance in early pregnancy—the contribution of seminal fluid. **Journal Reproduction Immunology**. v.83, p.109–116, 2009.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Methods for sperm evaluation and their relationship to fertility. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16, 2005, Goiânia, GO. **Anais...**Goiânia, GO:Colégio Brasileiro de Reprodução, 2005.
- ROTA, A.; PENZO, N.; VICENTI, L.; MANTOVANI, R. Hypoosmotic swelling test (HOS) as a screening assay for testing *in vitro* fertility of bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v.53, p.1415-1420, 2000.
- SARIOZKAN, S.; BUCAK, M.N.; TUNCER, P.B.; ULUTAS, P.A.; BILGEN, A. The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. **Cryobiology**, v.58, p.134–138, 2009.
- SAVI, P.A.P. Uso de antioxidantes no meio diluente Tris para a refrigeração e congelamento de células espermáticas provenientes de epidídimo de cães submetidos à orquiectomia eletiva. **Tese**, Unesp, Jabotibal, 2012.

SAVI, P.A.P.; MOTHEO, T.F.; PADILHA-NAKAGI, L.C.; PIRES-BUTTLE, E.A.; VICENTE, W.R.R. Técnica modificada de compressão do ducto deferente e cauda do epidídimo para obtenção de espermatozoides caninos. **Investigação**, v.44, n.1, p18-22, 2015.

SAWYER, D.E.; MERCER, B.G.; WIKLENDT, A.M.; AITKEN, R.J. Analysis of genespecific DNA damage and single-strand DNA breaks induced by prooxidant treatment of human spermatozoa in vitro. **Mutation Research**, v.529, p.21–34, 2003.

SCHIMMING, B.C.; VICENTINI, C.A.; ORSI, A.M. Estudio al microscopio electrónico de barrido del epidídimo en el perro (*canis familiaris*, l.). **Revista Chilena de Anatomia**, v.19, n.2, 2001.

SHARMA, R.K.; PASQUALOTTO, A.E.; NELSON, D.R.; THOMAS, A.J.; AGARWAL, A. Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. **Journal of Andrology**, v.22, p.575–583, 2001.

SHI, Y.; PULLIAM, D.A.; LIU, Y.; HAMILTON, R.T.; JERNIGAN, A.L.; BHATTACHARYA, A.; SLOANE, L.B.; QI, W.; CHAUDHURI, A.; BUFFENSTEIN, R.; UNGVARI, Z.; AUSTAD, S.N.; VAN REMMEN, H. Reduced mitochondrial ROS, enhanced antioxidant defense, and distinct age-related changes in oxidative damage in muscles of long-lived *Peromyscus leucopus*. **American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology** v.304, p.R343–R355, 2013.

SILVA, P.F.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v.65, p.958–78, 2006.

SISSON, S.; GROSSMAN, J. D. **Anatomia dos animais domésticos**. 5ª ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1986. 2v

SIRIVADYAPONG, S. Motility and viability of canine epididymal sperm collected by different methods. In: **EVSSAR EUROPEAN CONGRESS ON REPRODUCTION IN COMPANION, EXOTIC AND LABORATORY ANIMALS**. Liege, 2002.

SIRIVADYAPONG, S.; BEVERS, M.M.; GADELLA, B.M.; COLENBRANDER B. Induction of the acrosome reaction in dog sperm cells is dependent on epididymal maturation: the generation of a functional progesterone receptor is involved. **Molecular Reproduction and Development**, v.58, p.451–9, 2001.

- SOSTARIC, E.; AALBERTS, M.; GADELLA, B.M.; STOUT, T.A.E. The roles of the epididymis and prostasomes in attainment of fertilizing capacity by stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v.107, p.237–248, 2008.
- STOREY, B.T. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. **Molecular. Human Reproduction**, v.3, p.203–213, 1997.
- STOREY, B.T. Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe. **The International Journal of Developmental Biology**, v.52, p.427–437, 2008.
- TAJIK, P.; ARMAN, A.; TAKTAZ, T. Bovine epididymal sperm morphology obtained from caput, corpus and cauda epididymides. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.10, p. 3936–3939, 2007.
- TARTAGLIONE, C.M.; RITTA, M.N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of *in vitro* fertility of frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v.62, p.1245-1252, 2004.
- THUWANUT, P.; CHATDARONG, K.; TECHAKUMPHU, M.; AXNÉR, E. The effect of antioxidants on motility, viability, acrosome integrity, and DNA integrity of frozen-thawed epididymal cat spermatozoa, **Theriogenology**, 70, 233-240, 2008.
- TSELKAS, K.; SARATSIS, P.; KARAGIANIDIS, A.; SAMOUILIDIS, S. Extracellular presence of reactive oxygen species (ROS) in fresh and frozen-thawed canine semen and their effects on some semen parameters. **Dtsch Tierarztl Wochenschr**, v.107, p.69–72, 2000.
- TSUTSUI, T.; WADA, M.; ANZAI, M.; HORE, T. Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v.65, p.397-399, 2003.
- TUNCER, P.B.; BUCAK, M.N.; BUYUKLEBLEBICI, S.; SARIOZKAN, S.; YENI, D.; EKEN, A.; AKALIN, P.P.; KINET, H.; AVDATEK, F.; FIDAN, A.F.; GUNDOGAN, M. The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull sêmen. **Cryobiology**, v.61, p.303–307, 2010.
- VARESI, S.; VERNOCCHI, V.; FAUSTINI, M.; LUVONI, G.C. Morphological and acrosomal changes of canine spermatozoa during epididymal transit. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.55, p.17, 2013.

- VARESI, S.; VERNOCCHI, V.; MORSELLI, M.G.; LUVONI, G.C. DNA integrity of fresh and frozen canine epididymal spermatozoa, **Reproductive Biology**, v.14, p.257-261, 2014.
- VARRICCHIO, E.; LANGELLA, M.; MAHARIAN, V.; PAINO, G. Structure and function of mammalian epididymis. **Acta Medica Veterinaria**, v.42, p.221-234, 1996.
- WAKAMATSU, T.H.; DOGRU, M.; MATSUMOTO, Y.; KOJIMA, T.; KAIDO, M.; IBRAHIM, O.M.; SATO, E.A.; IGARASHI, A.; ICHIHASHI, Y.; SATAKE, Y.; SHIMAZAKI, J.; TSUBOTA, K. Evaluation of lipid oxidative stress status in Sjogren syndrome patients. **Investigative Ophthalmology & Visual Science** v.54, p.201–210, 2013.
- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function, **Reproduction Fertility and Development**, v7, p.871–891, 1995.
- WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction. Science**, v.60-61, p.482–492, 2000.
- WATSON, P.F. The preservation of semen in mammals. In: FinnCA(ed.), **OxfordReviews of Reproductive Biology**, Vol. 1. Oxford University Press, Oxford, pp. 283–351, 1979.
- YU, I.; LEIBO, S.P. Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C. **Theriogenology**, v.57, p.1179-90, 2002.
- ZINI, A.; SIGMAN, M. Are tests of sperm DNA damage clinically useful? Pros and cons. **Journal of Andrology**, v.30, p.219–229, 2009.
- ZUCCARI, C.E.SN; LEITE, P.A.; PASSOS, T.S.; CARRIJO, P.R.; KIEFER, C. Correlação entre métodos de avaliação da integridade da membrana plasmática do espermatozóide bovino criopreservado. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.10, 2009.

ANEXO A

Protocolo Anestésico:

- MPA:
 - Clorpromazina 0,5mg/kg
 - Cloridrato de Tramadol 2mg/kg
- Indução:
 - Propofol 2mg/kg
- Manutenção
 - Isoflurano
- Antibiótico
 - Benzilpenicilina 40.000 UI/kg

ANEXO B

Preparo da solução de fructose a 100 mOsm/Kg, empregado no teste Hiposmótico (Revell e Mrode, 1994):

- Frutose 0,9g
- Citrato Trisódico 0,49g
- Água destilada (q.s.p.) 100 mL

ANEXO C

Solução estoque e de trabalho empregadas na técnica de fluorescência para avaliação da integridade de membrane (ZÚCCCARI, 1998):

I - Solução estoque de DIC

DIC - 9,2mg

DMSO - 20mL

II - Solução estoque de IP

IP - 10mL

NaCl 0,9% - 20mL

III - Solução estoque de Formaldeído

Formalina a 40% e solução fisiológica, diluição 1:80.

VI - Solução estoque de citrato de sódio a 3%

Citrato de sódio - 3g

Solução fisiológica - 100mL

V - Solução de trabalho

DIC - 20 μ L

IP - 10 μ L

Formaldeído - 10 μ L

Solução IV - 960 μ L

ANEXO D

Dissolver a 3,3' – diaminobenzidina (DAB) tampão fosfato de sódio 0,15M, pH 7,2, a uma concentração de 1mg/mL (HRUDKA , 1987).

ANEXO E

Solução de TBA para a realização do teste de lipoperoxidação:

- 15% de Ácido Tricloroacético
- 0,275% de Ácido Tiobarbitúrico
- 0,25M de Ácido Clorídrico