

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

Bethania Vieira Lopes

**EFEITO DA ADIÇÃO E / OU SUPLEMENTAÇÃO
DE ANTIOXIDANTE NO PROCESSO DE
CONGELAÇÃO/DESCONGELAÇÃO DE SÊMEN
DE CÃES FÉRTEIS E SUBFÉRTEIS**

BOTUCATU – SÃO PAULO

2010

Bethania Vieira Lopes

**EFEITO DA ADIÇÃO E /OU SUPLEMENTAÇÃO DE
ANTIOXIDANTE NO PROCESSO DE
CONGELAÇÃO/DESCONGELAÇÃO DE SÊMEN
DE CÃES FÉRTEIS E SUBFÉRTEIS**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, Área de Reprodução Animal.

Orientadora: **Prof^a. Dr^a. Maria Denise Lopes**

BOTUCATU – SÃO PAULO

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Lopes, Bethania Vieira.

Efeito da adição e /ou suplementação de antioxidante no processo de
congelamento/descongelamento de sêmen de cães férteis e subférteis / Bethania
Vieira Lopes. - Botucatu, 2010

Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade
Estadual Paulista, 2010

Orientadora: Maria Denise Lopes

Capes: 50504002

1. Reprodução animal. 2. Sêmen – Criopreservação. 3. Cão.

Palavras-chave: Antioxidantes; Cães; Criopreservação; Estresse oxidativo;
Subfertilidade.

Nome do autor: Bethania Vieira Lopes

Data da defesa: 27/08/2010

Título: Efeito da Adição e/ou Suplementação de Antioxidante no Processo de Congelamento/Descongelamento de Sêmen de Cães Férteis e SubFérteis.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dra. Adj. Maria Denise Lopes
Presidente e Orientadora
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Campus de Botucatu

Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Campus de Botucatu

Prof. Dra. Fabiana Ferreira de Souza
Membro
Universidade de Franca

Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi
Membro
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária
FCAV – UNESP – Campus de Jaboticabal

Prof. Gilson Hélio Toniollo
Membro
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal
FCAV – UNESP – Campus de Jaboticabal

Dedicatória

Ao meu amigo, companheiro, marido e amor da minha vida, **Lucas**.

A minha **família** que sempre me apoiou mesmo a distância.

Agradecimentos:

A minha orientadora **Maria Denise Lopes**, por ter me “trazido” para Botucatu, possibilitando um crescimento profissional e pessoal. Uma pessoa que foi como uma segunda mãe, apoiando e brigando sempre que necessário.

Ao prof. **Frederico Ozanam Papa**, que sempre se mostrou disposto a colaborar e trocar idéias sobre o projeto.

Ao meu amor, **Lucas**, por toda paciência, compreensão, companheirismo e amor.

A minha **família**, por ter suportado a distância e por ter se mantido presente.

Aos meus sobrinhos: **Ian, Teo e Eric** pelo amor e sorrisos.

A **FAPESP** pela concessão da Bolsa e auxílio financeiro

A **Royal Canin** pelo fornecimento da ração dos animais do experimento.

A **Polícia Militar de Bauru** que nos recebeu muito bem, auxiliando nos trabalhos. Em especial a sub tenente Eliete e aos cabos Samuel, Mateus, Neto, Carvalho e todos aqueles que me auxiliaram.

Gabriel Augusto Monteiro, pelo auxílio durante todo o experimento.

A amiga **Jeanne Siqueira** que dividiu comigo o teto além de bons e maus momentos.

Aos animais que participaram do experimento: **Boneco, Balboa, Maradona, Xacal, Duque, Tucupi, Bred, Leroy, Max, Thor, Sarks, Oreó e Falcão**, pela colaboração com a ciência.

Aos meus cães: **Olive** (a mais feliz do mundo), **Nizza** (uma mistura de força e serenidade), **Jung** (o cachorro mais meigo que já conheci), **Nala** (a mais maluca), **Totó** (fofo) por todo amor incondicional e momentos compartilhados.

As amigas desde o primeiro mês de Botucatu: **Ana Augusta, Ieda, Bruna e Vivi**, por todos os momentos compartilhados, por todos os papos produtivos ou não nestes três anos.

Aos amigos **Cely, Luis e Ian** pelos almoços, passeios e bons momentos compartilhados.

Ao amigo e herói **Rodrigo Volpato**, por ter encontrado meu cão, possibilitando uma defesa de doutorado mais tranqüila.

Aos amigos **André Crespilho, Marcel Falleiros e Eduardo Trevisol**, por terem ajudado a procurá-lo, por todas as conversas e amizade.

Aos funcionários do departamento: **Cristina, Walter, Dona Raquel e Edilson**.

A todos os amigos de departamento, entre eles: Carla, Gustavo, Camila, Zé, Leandro, Claudinha, Rosiara...Muito obrigada pelo convívio harmonioso.

Aos amigos e companheiras de laboratório: **Renata, Camila, Ana Izabel**.

A todos aqueles que contribuíram de uma forma ou outra para a execução deste trabalho.

Lista de abreviaturas

CASA - Computer-Assisted Semen Analyzer

FITC-PSA - Glutinina de *Pisum sativum* Conjugada a Isotiocianato de Fluorescência

IP - Iodeto de Propídio

L - Litro

MDA - Malondialdeído

mg - Miligrama

mL – Mililitro

mM - miliMolar

RAP – percentual de espermatozóides com movimento rápido

RL – Radicais livres

ROS – Espécies reativas ao oxigênio

SOD – Superóxido dismutase

TBARS – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico

VAP - Velocidade do trajeto espermático

VCL - Velocidade curvilinear

VSL -Velocidade progressiva

RESUMO

LOPES, B.V. **“Efeito da adição e ou suplementação de antioxidante no processo de congelação/descongelação de sêmen de cães férteis e subférteis.** Botucatu, 2010. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – Área de Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP.

O objetivo desse projeto foi determinar a eficiência do uso de antioxidantes na prevenção de efeitos deletérios da congelação de sêmen em cães férteis e subférteis. Para isso foram executados dois experimentos: O primeiro teve como objetivo comparar os resultados da congelação do sêmen de cães férteis e subférteis, utilizando meio diluente a base de TRIS/gema de ovo/glicerol, com a adição ou não de antioxidantes (Catalase, Superóxido Dismutase e suas associações, ácido ascórbico, tocoferol e suas associações). O segundo experimento teve como objetivo comparar os resultados da congelação do sêmen de cães férteis e subférteis, suplementados com 500mg de vitamina C e E, por via oral, durante 60 dias. Foram utilizados 13 cães, sendo 7 considerados férteis e 6 classificados com subférteis. Os cães férteis apresentavam exame andrológico dentro dos padrões recomendados pelo CBRA; os subférteis apresentavam baixa concentração espermática ($< 20 \times 10^6$ spz/mL) e/ ou alto índice de patologias espermáticas ($> 30\%$). O sêmen foi congelado em três momentos, antes do início da suplementação (M1), 30 (M2) e 60 dias (M3) após o início da suplementação oral. O sêmen foi coletado por manipulação digital do pênis e analisado para: motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática. A congelação do sêmen foi realizada pelo método descrito por Chirinéa et al. (2006). A descongelação foi realizada a 70°C por 8 segundos. Logo após as amostras foram avaliadas na análise computadorizada (CASA) e avaliação de integridade de membrana acrossomal e plasmática. Também foi analisada a taxa de peroxidação lipídica e antioxidantes: SOD, catalase, vitaminas C e E no plasma seminal. Pode-se concluir que a suplementação oral, no meio diluente ou a sua associação pode trazer benefícios para o processo de congelação/descongelação de cães. Principalmente para aqueles que possuem problemas reprodutivos, podendo inclusive, com a terapia oral reduzir ou eliminar esta característica.

Palavras-chave: Cães, criopreservação, antioxidantes, subfertilidade, estresse oxidativo

Abstract

LOPES, B.V. **“Efeito da adição e ou suplementação de antioxidante no processo de congelação/descongelação de sêmen de cães férteis e subférteis.** Botucatu, 2010. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – Área de Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP.

The aim of this project was to determine the efficiency of antioxidants in preventing the deleterious effects of freezing semen in fertile and subfertile dogs. For this purpose two experiments were performed: The first aim was to compare the results of frozen semen of fertile and subfertile dogs, using the TRIS diluent / egg yolk / glycerol extender, with or without addition of antioxidants (Catalase, Superoxide dismutase and their associations, ascorbic acid, tocopherol and their associations). The second experiment aimed to compare the results of frozen semen of fertile and subfertile dogs supplemented with 500mg of vitamin C and E, orally for 60 days. We used 13 dogs, 7 were considered fertile and 6 classified as subfertile. The dogs had been considered fertile breeding soundness examination within the standards recommended by CBRA; the subfertile had lower sperm concentration ($<20 \times 10^6$ spz / mL) and / or high rate of sperm pathologies ($> 30\%$). Semen was frozen in three stages, before the start of supplementation (M1), 30 (M2) and 60 days (M3) after the initiation of supplementation. Semen was collected by digital manipulation of the penis and analyzed for: motility, vigor, concentration and morphology. The frozen semen was performed by the method described by Chirinea et al. (2006). Thawing was performed at 70°C for 8 seconds. Soon after the samples were evaluated in the computerized analysis (CASA) and assessment of membrane integrity and acrosomal plasma. We also analyzed the rate of lipid peroxidation and antioxidants: SOD, catalase, vitamins C and E in seminal plasma. It can be conclude that oral supplementation, in the extender or your association can benefit the process of freezing / thawing of dogs. Especially for those with reproductive problems and may even, with oral therapy to reduce or eliminate this feature.

Key words: Dogs, cryopreservation, antioxidants, subfertile, oxidative stress oxidativo

1. Introdução:

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a população mundial de cães ultrapassa 600 milhões, número que deve dobrar em 10 anos. Esta população gerou o crescimento do chamado mercado *pet*, uma rede de serviços e produtos especializados nos animais de companhia, principalmente para os cães. Assim, da mesma forma, cresceu a procura pela criação e reprodução canina, impulsionando a pesquisa e o desenvolvimento das biotécnicas reprodutivas para esta espécie. Nesse contexto, a criopreservação de sêmen recebeu atenção especial, pois se torna possível preservar o material genético de um animal de alto valor zootécnico ou grande valor afetivo. O estudo da espécie canina também se faz necessário pelo fato de que ela serve como modelo experimental para os canídeos silvestres, já que muitas espécies encontram-se em risco de extinção.

Porém, até os dias de hoje não se tem resultados satisfatórios e homogêneos na pós descongelação do sêmen de cão. Por este motivo, muitos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de incrementar os parâmetros seminais e os índices de fertilidade pós descongelação. O conhecimento da(s) causa(s) pelo qual o sêmen dos cães não responde bem ao processo de congelamento/descongelamento ainda é motivo de muitas pesquisas.

Uma das hipóteses mais aceitas e estudadas na atualidade é a de que o estresse oxidativo é o grande causador da perda da capacidade fertilizante do espermatozóide. Esta hipótese tem sido muito considerada levando-se em conta que o espermatozóide tem na composição de sua membrana uma grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados e de perder boa parte do seu citoplasma durante a espermatogênese, o que o torna particularmente susceptível ao processo de estresse oxidativo.

O estresse oxidativo é causado por um desbalanço entre a concentração de antioxidante e das espécies reativas de oxigênio (ROS) (Sikka, 2004). Quando essa situação ocorre em grandes proporções, pode levar a perda da capacidade fertilizante do espermatozóide ou até mesmo a morte celular.

Estudos em humanos concluíram que pacientes com problemas reprodutivos apresentam grandes quantidades de ROS no sêmen, o que causa uma grande concentração de espermatozoides com alteração estrutural e

Introdução

oligozoospermia, provavelmente por aumentar a taxa de apoptose ainda durante a espermatogênese.

Desta maneira, acredita-se que diminuindo a concentração de ROS ou aumentando o sistema antioxidante, pode-se diminuir o estresse oxidativo e os danos causados por ela; dessa forma, seria possível aumentar os parâmetros seminais pós descongelação.

Diante do exposto, acredita-se que a adição de moléculas antioxidantes no meio diluente pode minimizar os danos causados pelo processo de congelação/descongelação e a suplementação diária na dieta, por um período mínimo de 60 dias, melhora as condições do sêmen a fresco, permitindo melhores resultados no processo de congelação/descongelação.

O objetivo deste experimento foi verificar se a adição de antioxidantes (enzimáticos e não enzimáticos) no diluente para congelação ou se a suplementação, por via oral durante 60 dias, seria capaz de diminuir o estresse oxidativo, aumentar os níveis de antioxidantes e assim melhorar as características seminais pós descongelação.

2. Revisão de Literatura

2.1 Congelação

A criopreservação espermática visa a suspensão do metabolismo, mas com a preservação de sua funcionalidade. Para a célula espermática isso significa manter sua capacidade fertilizante após o processo de congelação/descongelação (HAMMERSTED et al., 1990).

O maior problema com relação a criopreservação do sêmen é que mesmo utilizando técnicas adequadas, a sobrevivência dos espermatozoides pós-descongelação é reduzida, representando aproximadamente 50% da população total (WATSON, 1995). Isto se deve ao fato de que a criopreservação espermática envolve muitas etapas, como a centrifugação, diluição, refrigeração, congelação e descongelação (LUVONI, 2006). Cada uma dessas etapas tem relação com a estrutura funcional do espermatozoide e seu metabolismo, mas também podem causar danos, levando a perda de sua capacidade fertilizante (AMANN e PICKETT et al., 1987; HAMMERSTED et al., 1990). Métodos de criopreservação específicos devem ser desenvolvidos para cada uma das espécies, pois cada uma dessas etapas tem um impacto único sobre a sobrevivência da célula no processo de criopreservação (HAMMERSTED et al., 1990). As principais causas de danos causados na criopreservação podem ser classificadas como: estresse osmótico e choque térmico (WATSON, 2000) e estresse oxidativo (AITKEN e KRAUSZ, 2001; SIKKA, 2004, AGARWAL et al., 2003).

Muitos estudos têm demonstrado que o estresse oxidativo induz dano as membranas espermáticas e ao DNA, fato que já foi comprovado em diversas espécies, como a humana (AITKEN, 1999; AGARWAL et al., 2003), equina (BAUMBER et al., 2000; BAUMBER et al., 2003), ovina (PERIS et al., 2007), suína (JEONG et al, 2009), canina (MICHAEL et al, 2007) felina (THUWANUT et al, 2008) e bovina (BILODEAU et al., 2002). Assim, torna-se importante o

estudo e o conhecimento dos oxidantes para que seja possível combatê-los de maneira adequada.

2.2 Estresse Oxidativo e Peroxidação Lipídica

As células, quando em condições aeróbicas enfrentam constantemente um paradoxo: o oxigênio é necessário para sua sobrevivência, mas seus metabólitos podem modificar o funcionamento das células, colocando a vida celular em risco (de LAMIRANDE e GAGNON, 1992a). Dependendo da concentração dos metabólitos provenientes da respiração aeróbica, a célula sofre o estresse oxidativo. Geralmente este termo é usado quando a concentração de oxidantes ultrapassa o de antioxidantes (AITKEN et al., 1994).

Os oxidantes são conhecidos como radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (ROS). Os radicais livres são definidos como um átomo, grupo de átomos ou molécula que possuem um elétron não pareado, ocupando uma órbita externa. Pode-se citar como exemplo: o ânion superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila ($\cdot OH$). As ROS são igualmente reativas, mas não possuem elétron não-pareado em sua última camada. Como exemplo de ROS, podemos citar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (DRÖGE, 2002). As duas principais fontes de ROS do espermatozóide são: o próprio espermatozóide (IWASAKI e GAGNON, 1992) e leucócitos no ejaculado (AITKEN et al., 1994). Conforme o consumo de oxigênio aumenta pelo metabolismo celular, aumenta-se também, o nível de radicais livres e ROS produzidos (GIL-GUZMAN et al., 2001).

Os espermatozoides maduros e as células germinativas imaturas produzem menos ROS do que os espermatozoides imaturos (KRUGER et al., 1987). Agarwal et al. (2003) relataram que o espermatozóide maduro de pacientes inférteis apresentavam altos níveis de apoptose, comparada com espermatozoides maduros de pacientes sem problemas de fertilidade.

A função das mitocôndrias é a produção de ATP, necessária para a função fisiológica. Porém, os elétrons que deixam o ciclo respiratório mitocondrial, contribuem para a produção do ânion superóxido, um potente radical livre no

espermatozóide (KOPPERS et al., 2008). Foi relatada uma correlação positiva entre o nível de apoptose e a concentração de ROS no sêmen. A hipótese sugerida pelos autores é que uma alta concentração de ROS pode romper as membranas interna e externa da mitocôndria, resultando na liberação do citocromo-C, ativando as caspases e assim induzindo a apoptose (AGARWAL et al., 2003).

O espermatozóide de mamíferos é particularmente sensível a peroxidação lipídica por possuírem grande quantidade de ácidos graxos polinsaturados na composição de suas membranas (WATSON, 1981). A ação dos radicais livres nos ácidos graxos poli-insaturados é maior do que nos monoinsaturados. As moléculas reativas, como o O₂, extraem com mais facilidade um átomo de hidrogênio dos poliinsaturados e permanecem com um elétron não pareado, formação de radical livre, do que dos ácidos graxos monoinsaturados. Depois que as moléculas reativas extraem um elétron, as reações se propagam em cadeia. As mitocôndrias também produzem peróxido de hidrogênio durante o metabolismo espermático, o que induz a peroxidação lipídica na membrana.

No espermatozóide essa reação ocorre devido à ligação do peróxido de hidrogênio com os ácidos graxos insaturados, principalmente com o ácido docosahexanóico, que parece ser particularmente sensível a peroxidação lipídica. Como este ácido representa cerca de 67% dos lipídios presentes na membrana acrossomal, o edema e desintegração do acrossoma são comumente observados em espermatozoides armazenados. A peroxidação lipídica também ocorre em outras estruturas do espermatozóide, resultando no aumento da permeabilidade da membrana plasmática, perda da integridade dessas membranas, diminuição da motilidade e viabilidade espermática (AMANN e GRAHAN, 1993). O dano causado pela peroxidação lipídica leva a perda de fluidez e integridade da membrana plasmática, tendo como consequência a perda da capacidade de fertilização (AITKEN et al., 1994, GRIVEAU e LE LANNOU, 1997).

A capacidade do estresse oxidativo/peroxidação lipídica de romper as membranas espermáticas foi primeiro relatada por MacLeod, em 1943 quando

Revisão de Literatura

reconheceu o impacto negativo de altas tensões de oxigênio na motilidade espermática (Revisado por AITKEN et al., 1998). Hoje já se sabe que as ROS podem reduzir a motilidade espermática através da diminuição da fosforilação da proteína do axonema, assim como pela peroxidação lipídica (DESAI et al., 2010)

O estresse oxidativo pode causar danos, na maioria das vezes irreversíveis, em todos os componentes celulares, como os lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e açúcares (Figura 1). A extensão dos danos causados, depende da natureza, da quantidade, do momento e da duração da exposição ao ROS. Também depende de fatores extracelulares, como temperatura, tensão de O₂ e da composição do meio (AGARWAL et al., 2003).

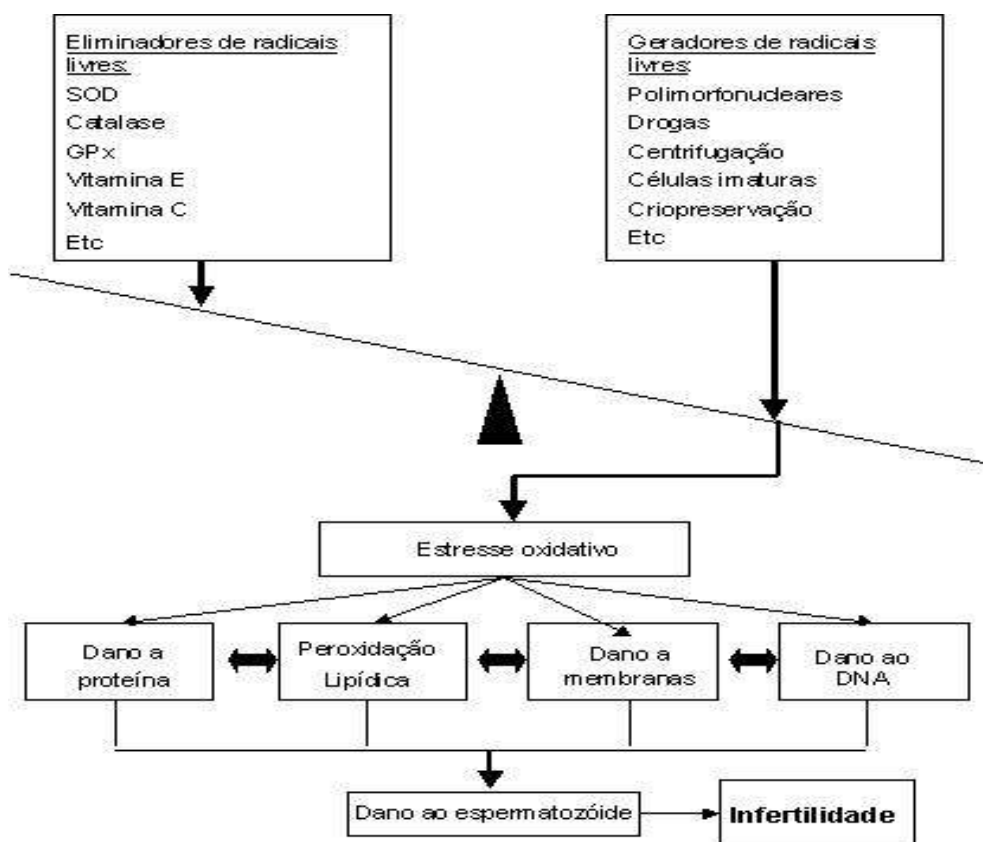


Figura 1 - Mecanismo de geração de estresse oxidativo levando a infertilidade. (Adaptado de SIKKA, 2004)

A relação entre ROS e a diminuição da motilidade espermática é devido a uma cascata de eventos que resulta em um decréscimo na fosforilação de proteínas do axonema e na imobilização espermática, ambos associados com a redução da fluidez da membrana (de LAMIRANDE e GAGNON, 1992b). Outra hipótese é que ao H_2O_2 pode atravessar a membrana das células e inibir a atividade de algumas enzimas como a G_6PA . (AGARWAL e SALEH, 2002). Esta enzima controla a taxa de influxo de glicose através de uma derivação da hexose-monofosfato, que regula a disponibilidade de NADPH intracelular. Este mecanismo também é usado como fonte de elétrons para o espermatozóide gerar ROS (AITKEN, 1997).

Altas concentrações de ROS são prejudiciais ao espermatozóide, porém uma concentração fisiológica deve existir, uma vez que os subprodutos da peroxidação lipídica são necessários para os processos fisiológicos pelos quais o espermatozóide deve se submeter (AITKEN et al., 1994). O ânion superóxido é responsável pela hiperativação da motilidade espermática e pelo aumento da afinidade do espermatozóide aos receptores da zona pelúcida (ZP), enquanto que o peróxido de hidrogênio parece ser um fator controlador da capacitação através da ativação de fosfoquinase (PKA) específica do espermatozóide (LECLERC et al., 1997; AITKEN et al., 1994), auxiliando na fosforilação da tirosina (LE CLERC et al., 1997). Esta fosforilação da tirosina sensibiliza os canais de cálcio levando a capacitação espermática e reação de acrossoma (De LAMIRANDE e GAGNON, 1992a; GRIVEAU e LE LANNOU, 1997).

Outra fonte de ROS para os espermatozóides são os leucócitos. A leucocitoespermia é relacionada a baixa qualidade espermática, diminuindo a hiperativação (WOLFF, 1995). Esta situação pode ocorrer em resposta a uma variedade de estímulos inflamatórios e infecciosos (PASQUALOTTO et al., 2000). As alterações decorrentes da leucocitoespermia ocorrem quando os leucócitos estão em concentração muito elevada ou quando o plasma seminal é retirado (OCHSENDORF, 1999). O plasma seminal proporciona proteção ao espermatozóide contra o estresse oxidativo (LENZI et al., 1993; BALERCIA et al., 2003), envolvendo as células espermáticas com um sistema antioxidante

altamente especializado, que protege as membranas espermáticas (KIM e PARTHASARATHY, 1998). O plasma seminal contém antioxidantes enzimáticos, como a SOD (NISSEN e KREYSEL, 1983; KOBAYASHI et al., 1991) e a catalase (LAHNSTEINER et al., 2010) , e não enzimáticos como a vitamina C (THIELE et al., 1995), vitamina E (THEROND et al., 1996), ácido úrico (RONQUIST e NIKLASSON, 1984; THIELE et al., 1995) e a Glutathione (AYDEMIR et al., 2007). Porém durante os processos de conservação espermática, o plasma seminal é geralmente removido, tornando o espermatozóide mais susceptível aos processos de peroxidação lipídica e estresse oxidativo. (JEULIN et al., 1988; VILLEGAS et al., 2003). Além disto, o armazenamento *in vitro*, a congelação e descongelação do espermatozóide, aumentam a concentração de peróxidos, indicando uma geração de ROS (LAHNSTEINER et al., 2010).

2.3 Antioxidantes

Para se proteger dos efeitos nocivos dos radicais livres formados durante o metabolismo, os organismos vivos desenvolveram mecanismos capazes de neutralizá-los. As substâncias capazes de neutralizar os radicais livres/ROS são os antioxidantes. Antioxidantes são, portanto, substâncias que quando presentes em concentrações mais altas, comparadas com os substratos oxidáveis, diminuem/retardam ou previnem significativamente a oxidação do substrato (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Para cada “alvo” do estresse oxidativo, existe um antioxidante adequado para sua defesa, por exemplo: o ascorbato é o melhor agente antioxidante para proteger o plasma sangüíneo contra a agressão causada pelo fumo, porém, este mesmo antioxidante não protege as proteínas plasmáticas contra esse mesmo agente agressor (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Os antioxidantes se ligam ao elétron livre dos radicais livres ou das ROS, impedindo sua ligação com os ácidos graxos. Os antioxidantes restabelecem o equilíbrio entre as moléculas oxidantes e antioxidantes no organismo, mantendo assim a integridade das membranas celulares e

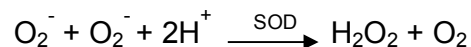
prevenindo danos ao DNA (AGARWAL e SALEH, 2002). A participação do antioxidante na manutenção da integridade dos ácidos insaturados é realizada em três etapas: o ácido graxo que perdeu o hidrogênio recebe o hidrogênio do antioxidante que se oxida. O antioxidante sofre rearranjo em sua molécula e, oxidado, se reduz, recebendo um novo hidrogênio e voltando a sua estrutura normal (ISLABÃO,1990).

Os antioxidantes podem ser classificados em dois tipos: os enzimáticos e os não-enzimáticos.

2.4 Antioxidantes enzimáticos

2.4.1 Superóxido Dismutase (SOD)

Inativa o ânion superóxido e é considerada a primeira linha de defesa contra o ROS. Sendo assim considerada como o principal mecanismo de proteção contra a peroxidação lipídica (BENDICH, 1990). Sua reação pode ser resumida na fórmula:



Existem dois tipos de SOD: mitocondrial que tem no manganês seu sítio ativo; e citosol, que tem o cobre e o zinco como seu sítio ativo. O cobre funciona como um agente catalisador e o zinco como estabilizador da estrutura protéica (BENDICH, 1990). O SOD protege contra a toxicidade espontânea do O_2^- e da peroxidação lipídica, sendo capaz de reduzir seus efeitos (HATAMOTO et al., 2006). Remove o O_2^- gerado pela NADPH-oxidase em neutrófilos e podem proteger os espermatozóides durante processos inflamatórios genito urinários (BAKER et al., 1996).

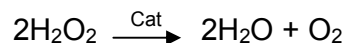
Aitken et al., (1996), observaram uma correlação negativa entre a concentração de SOD e as taxas de motilidade espermática e sua capacidade de fusão com o oócito; esses autores atribuíram essa correlação ao fato de que a célula espermática é altamente susceptível a ação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2 - que é gerado pela sua reação com o ânion superóxido). Um estudo

realizado por Tavilani et al., (2008) comprovou que ao eliminar o ânion superóxido, a SOD protege o espermatozóide contra a peroxidação lipídica.

De acordo com Taylor (2001), o SOD extracelular se liga a região do colo dos espermatozóides, os quais mantêm a motilidade por mais tempo. Cerolini et al.; (2001) relataram que amostras com níveis altos de espermatozóides viáveis após o processo de congelação/descongelação, apresentavam uma maior atividade de SOD.

2.4.2 Catalase

A catalase é uma das enzimas mais eficientes e se localiza principalmente nos peroxissomos das células de mamíferos. Ela atua como catalisador da reação que transforma duas moléculas de H₂O₂ em duas de água (H₂O) e uma de oxigênio (O₂) (BENDICH, 1990).



Assim como a SOD, a catalase remove o O₂⁻ gerado pela NADPH-oxidase em neutrófilos e pode proteger os espermatozóides durante processos inflamatórios genito urinários (BAKER et al., 1996). Sua principal vantagem é o fato de não ser saturada por concentrações do seu substrato, por este motivo, embora não esteja presente em todos os tipos celulares, exerce um papel fundamental na tolerância ao estresse oxidativo (MATES e SANCHES-JIMENEZ, 2000).

2.5 Antioxidantes não-enzimáticos

2.5.1 Vitamina E

Existem quatro isoformas do tocoferol (do grego: *tocos* = nascimento de crianças e *fero*= promover) e tocotrienol, sendo: α , β , γ e δ , de acordo com a posição do grupo metila no anel cromático. Os tocoferóis e tocotrienóis se diferenciam pela saturação de sua cadeia lateral, sendo os tocoferóis com cadeia totalmente saturada e os tocotrienóis com ligações duplas nas posições

3', 7', 11'. Desta forma, o termo vitamina E representa oito compostos químicos isômeros e que exercem a mesma função (BLATT et al., 2001).

A vitamina E é o maior antioxidante de membrana lipossolúvel encontrado em células, ele protege a dupla ligação de ácidos graxos insaturados da oxidação, doando elétrons para os radicais livres (BENDICH, 1990). A peroxidação lipídica é uma reação em cadeia, onde radical gera radical, então o principal é quebrar essa reação em cadeia pela formação de produtos não – radicais (SIES, 1993). A vitamina E é o melhor antioxidante, se não o único, a quebrar essa cadeia membranas, sendo, assim, um dos antioxidantes mais eficientes, reagindo cerca de 200 vezes mais rápido com o radical peroxil do que um antioxidante sintético como o Butilhidroxitolueno (BHT). Velocidade suficiente para impedir a reação deste radical com outro ácido graxo insaturado (BURTON et al., 1985) e assim quebrar a cadeia.

A vitamina E, também tem a vantagem de agir mesmo em concentração muito pequena (BUETTNER, 1993) e de ser um agente biológico modificador, trabalhando sinergicamente com a vitamina C. Sendo, inclusive, mais eficiente quando usadas em associação, já que a vitamina C recicla a vitamina E (ROLF et al., 1999). A vitamina E também forma complexos com os fosfolípidios da membrana, estabilizando-as através de ligações Van der Waals (BRADFORD et al., 2003).

2.5.2 Vitamina C

A vitamina C é insolúvel na maior parte dos solventes orgânicos, porém, é hidrossolúvel e pode doar elétrons para os radicais livres, neutralizando sua reatividade e, desta forma, protegendo as células (PADH, 1991). É capaz de reduzir as ações de radicais livres tanto em meio intra ou extracelular (BENDICH, 1990).

A vitamina C ainda não tem função fisiológica precisa na reprodução. Mas possui três funções que parecem estar relacionadas, uma vez que esta vitamina parece ser necessária para a biossíntese de colágeno, de

esteróides e hormônios peptídeos, além de prevenir ou diminuir a oxidação de biomoléculas (LUCK et al., 1995). Acredita-se que a vitamina C elimine o ânion superóxido e o oxigênio singlet, protegendo assim, as lipoproteínas dos danos oxidativos (DONNELLY et al., 1999).

Alem disso, sabe-se que ela auxilia na manutenção da integridade genética e que o excesso e/ou deficiência da vitamina C pode causar problemas reprodutivos. A diminuição de ácido ascórbico no sêmen de homens causa uma diminuição na atividade das enzimas antioxidantes, como a SOD, Glutathione Peroxidase e catalase, também aumenta os níveis de peróxido de hidrogênio e de peroxidação lipídica no espermatozóide epididimário (POTTS et al., 1999). Uma alta concentração de vitamina C foi encontrada no fluido epididimário e no plasma seminal, sendo assim considerada como uma vitamina protetora do epidídimo (DAWSON et al., 1987). Uma alta concentração (entre 1,9 e 12mg/g) de vitamina C também está presente em testículos de animais adultos saudáveis (SONMEZ et al., 2005).

2.6 Suplementação oral com antioxidantes

O principal objetivo da suplementação com antioxidantes oral, na dieta, é aumentar a concentração espermática, uma vez que os antioxidantes podem diminuir a apoptose durante a espermatogênese, o armazenamento espermático e no trânsito do trato genital (SIKKA, 2004).

Em um estudo com cães submetidos a um tratamento com dexametasona, observou-se uma diminuição na qualidade seminal. Porém, quando estes animais receberam uma dieta suplementada com vitamina E (500mg/dia, por 8 semanas), obteve-se melhora na concentração espermática ($127,92 \times 10^6$ no grupo suplementado e $73,2 \times 10^6$ spz/mL no grupo não suplementado). Neste experimento observou-se também um aumento da motilidade espermática em animais que não foram submetidos ao tratamento com dexametasona, mas que foram suplementados com vitamina E (67,7% para os animais suplementados e 54,6% para os animais não suplementados), no volume da segunda-fração do

ejaculado (2,92mL e 2,76 mL, respectivamente), da concentração espermática ($78,78 \times 10^6$ spz/mL e $61,25 \times 10^6$ spz/mL, respectivamente) e uma diminuição do número de espermatozóides anormais (10% e 18,14%, respectivamente). Os autores atribuíram seus resultados ao fato de que a suplementação oral com vitamina E diminui a peroxidação lipídica protegendo a célula espermática contra os efeitos deletérios da peroxidação lipídica (HATAMOTO et al., 2006)

A suplementação da dieta de cães, por 60 dias, com Omega-3, Omega-6 e vitamina E aumentou o volume da segunda-fração do ejaculado, de 1,89 para 2,15mL, da concentração espermática de 205,9 para 234×10^6 spz/mL, além de diminuir a porcentagem de espermatozóides anormais, de 12,9% para 7%. Os autores atribuíram seus resultados ao fato de que estes ácidos graxos aumentaram a capacidade de produção espermática pelas células testiculares (ROCHA et al., 2009).

Em coelhos a suplementação na dieta com vitamina C e/ou E por 12 semanas diminuiu a taxa de peroxidação lipídica, aumentou a libido, o número de espermatozóides com defeitos, o volume do ejaculado, a concentração e motilidade espermática, o pH e a concentração inicial de frutose no sêmen, sendo que estes efeitos foram mais pronunciados no grupo suplementado com vitamina C e E conjuntamente (YOUSEF et al. 2003).

Quando a dieta de coelhos foi suplementada com óleo de peixe e/ou vitamina E (α e δ – tocoferol) houve uma alteração na composição lipídica das membranas espermáticas, porém não houve alteração da qualidade seminal, nem melhora da susceptibilidade do sêmen a peroxidação lipídica, mas foi observado um aumento da concentração espermática (GLIOZI et al., 2008).

A suplementação de vitamina A ou C na dieta de coelhos, não afetou os parâmetros seminais, mas a suplementação com as vitaminas A e C combinadas, aumentou a viabilidade e a cinética espermática, associada com uma melhora na taxa de fertilização (CASTELLINI et al, 2000).

Em suínos, a suplementação com óleo de peixe, aumentou a viabilidade, a motilidade espermática progressiva, assim como o número espermatozóides com acrossoma intacto (ROOKE et al., 2001). A suplementação da dieta de suínos com ácidos graxos poliinsaturados aumentou a atividade de SOD, o que está associado com uma alta porcentagem de espermatozóides viáveis (STRZEŻEK et al., 2004). Estes autores observaram que a suplementação da dieta com ácidos graxos poliinsaturados mudou as características bioquímicas do espermatozóide suíno, o que trouxe um efeito positivo na preservação espermática.

Para a verificação da eficácia de suplementação com antioxidantes na dieta de suínos, um grupo de animais foi submetido a um período de colheita seminal intensa. Este grupo foi então separado em três subgrupos: **1.** Os que não receberam qualquer tipo de suplementação, **2.** Os que receberam suplementação com antioxidantes hidrossolúveis e **3.** Os que receberam suplementação com antioxidantes lipossolúveis. Como resultado, observou-se que no grupo onde a suplementação foi feita com antioxidantes hidrossolúveis houve uma maior produção espermática, quando comparada com o grupo controle. No grupo 2, dos antioxidantes lipossolúveis, houve apenas uma tendência de aumento na concentração espermática. O mesmo resultado foi observado na motilidade espermática, mas não na morfologia espermática e nem no teste de termoresistência. Os autores concluíram que a suplementação com vitaminas pode ser necessária quando há um aumento na frequência das coletas seminais. Os autores alegaram que a estas vitaminas estão envolvidas no processo de espermatogênese (AUDET et al., 2004).

Em ratos Wistar, suplementados com vitamina C, tanto na dose de 500 quanto na de 250mg/kg/dia por 8 semanas, observou-se uma queda na taxa de peroxidação lipídica, além de um aumento na concentração espermática e na testosterona plasmática (SONMEZ et al. 2005). Estes autores acreditam que a vitamina C ative a secreção de LH, beneficiando a espermatogênese.

Ratos nascidos de fêmeas que tiveram uma dieta deficiente de selênio, foram divididos em dois grupos, ambos suplementados com vitamina E, mas com a adição ou não de selênio. Observou-se que apesar de todos os animais apresentarem uma espermatogênese ativa em seus túbulos seminíferos, apenas os animais com a suplementação de vitamina E e selênio apresentaram alta motilidade espermática e baixo número de espermatozoides anormais. Esses autores levantaram a hipótese de que o selênio é fundamental para a formação do flagelo na espermatogênese ou na qualidade da membrana que envolve o flagelo. Estes mesmos autores suplementaram a dieta dos animais com diferentes antioxidantes (ácido ascórbico, BHT, N,N'-Difenil-n-fenil-diamina e azul de metileno) mas deixaram o selênio deficiente na dieta e concluíram que o selênio exerce uma função específica no testículo, provavelmente relacionada com a espermiogênese e que não pode ser substituída por nenhum outro antioxidante, já que nenhum preveniu as disfunções causadas por sua deficiência (WU et al., 1973).

Em eqüinos, a suplementação diária com vitamina C, E e carnitina não demonstrou efeito significativo na qualidade seminal. Os autores alegaram que o sêmen de eqüinos não é tão susceptível ao estresse oxidativo quanto os de outras espécies (DEICHSEL et al., 2008)

Em bodes, suplementação de vitamina E na dieta, em diferentes concentrações por 5 meses, resultou em proteção do tecido testicular aos danos oxidativos, no entanto, a resposta a este antioxidante não foi proporcional a dose utilizada na dieta (HONG et al, 2010).

2.7 Adição de antioxidantes na congelação de sêmen

Utilizando sêmen de cão e diluente a base de TRIS/gema de ovo/glicose, Michael e colaboradores (2007) observaram que a adição de catalase (300U/mL) ao meio diluente aumentou a motilidade espermática, quando comparado com o grupo controle (49,75% X 39%, $p < 0,001$), a viabilidade espermática (66% X 51,7%, $p < 0,001$) e integridade de

membrana espermática (61,75% X 55,65%, $p < 0,001$) e no número de espermatozóides com morfologia normal (81,1% X 77,9%, $p=0,01$).

Monteiro e colaboradores (2009), observaram que a adição de GSH no meio diluente na concentração de 1 e 5mM não alteraram os resultados de motilidade espermática pós descongelação, quando comparados com o grupo controle (61% e 63,5% contra 62,3%, respectivamente), mas houve um aumento do número de espermatozóides com a membrana plasmática intacta (40,1% e 42% contra 26,2%), houve também uma diminuição do número de espermatozóides anormais quando a concentração de 1mM foi usada (22,2% contra 30,1%).

Baptista Sobrinho (2009) relataram que a adição de GSH nas concentrações de 1, 5 e 10mM não diferiram entre si e entre o grupo controle para motilidade espermática (23,87%, 21,78% e 21,67% e 17,33%, respectivamente), integridade de acrossoma (53,79%, 55,92%, 57,42% e 54,58%, respectivamente) e concentração de TBARS (902,4, 1071,6, 984,46 e 893,6, respectivamente). A adição de vitamina C no meio diluente, nas concentrações de 50 e 250 μ M melhorou a motilidade espermática pós descongelação (72% e 72% contra 62,3%, respectivamente), mas houve um aumento dos defeitos espermáticos pós descongelação (25,2%, 24,5% contra 20,4%, respectivamente)

A adição de 200 μ L de Trolox no meio diluente de sêmen bovino aumentou a viabilidade espermática, a taxa de blastocisto e as taxas de gestação (BORGES et al, 2008). A vitamina E diminui a peroxidação lipídica das membranas espermática através da manutenção dos níveis da SOD (BECONI et al., 1991). De acordo com estes autores, em bovinos estressados, a vitamina E adicionada ao meio diluidor evitou a perda de motilidade espermática.

Córdoba et al. (2006) observaram inibição da capacitação espermática quando utilizaram a adição de SOD e/ou Catalase ao meio diluente, confirmando que o ânion superóxido é necessário para a capacitação

espermática. Na criopreservação do sêmen bovino, a mitocôndria tem um papel importante na produção de energia oxidativa, mantendo o estado reduzido nas célula.

Existem fortes evidências indicando que a suplementação do meio com eliminadores de ROS, agentes redutores ou cátion quelantes divalentes são benéficos ao desenvolvimento embrionário *in vitro*. Podemos citar: um aumento nas taxas de clivagem e uma maior tolerância do espermatozóide a descongelação, promovendo uma taxa maior blastocisto nas espécies suína e bovina (SAWAI et al., 1997; DE MATOS et al., 1996).

Adição de antioxidantes (Trolox e Cisteína) no meio diluente aumentou a motilidade espermática total e progressiva, integridade de membrana acrossomal, e integridade de DNA, pós descongelação de espermatozoides provenientes do epidídimo de gatos. Enquanto que a adição de catalase ou SOD no meio diluente não trouxe nenhum efeito positivo na qualidade seminal pós descongelação de sêmen de gatos (THIANGTUN et al., 2009).

Em bode, a adição de ácido α -lipóico ao meio diluente, resultou em um aumento de motilidade espermática e uma redução aos danos ao DNA. O ácido α -lipóico, é um antioxidante capaz de reciclar a vitamina C, reduzindo a vitamina C na presença de Glutathione, (IBRAHIM et al., 2008).

O sêmen de suínos parece ser um dos mais sensíveis ao dano oxidativo, provavelmente devido a composição de sua membrana apresentar uma alta concentração de ácidos graxos poliinsaturados e ter uma baixa capacidade antioxidante no plasma seminal (BREININGER et al, 2005). A adição de vitamina E no meio diluente apresentou bons resultados nos parâmetros espermáticos pós-descongelação.

Cerolini e colaboradores (2001) demonstraram que em amostras seminais de suínos caracterizadas por um alto índice de atividade de SOD e uma alta proporção de Glutathione peroxidase selênio dependente antes da

congelamento, apresentam viabilidade espermática pós-descongelamento superior.

A adição de Catalase (50µg/mL) e/ou Trolox (50 µM x 10⁸espermatozoides) foi testada em sêmen de carneiros e observado que a catalase manteve os mesmos padrões da cinética espermática do que o grupo controle, mas que o Trolox e a associação Trolox/Catalase obteve índices inferiores. O grupo onde houve a adição de catalase também obteve melhores índices de espermatozoides viáveis quando comparados com o grupo controle, enquanto que os demais grupos não diferiam do grupo controle (MAIA et al., 2009).

Também utilizando sêmen de carneiro, foi observado que a adição de catalase, em concentração de 100U/mL, no meio diluente resultou em efeitos positivos na descongelamento de sêmen, porém, o mesmo efeito não pode ser observado quando se utilizou sêmen sexado. Os autores alegaram que o sêmen sexado sofre estresse oxidativo maior durante sua separação no citômetro de fluxo. Outra possível explicação para os resultados obtidos foi a viabilidade maior pós descongelamento de sêmen sexado gerando menor quantidade de ROS. (de GRAAF et al, 2007).

3. Objetivos

- Verificar a eficiência da adição de antioxidantes (enzimáticos e não enzimáticos) no meio diluente para o procedimento da congelação/descongelação de sêmen de cães férteis e subférteis.
- Verificar o efeito da suplementação oral de vitamina C e E associada a adição de antioxidantes no meio diluente de congelação sobre os parâmetros espermáticos pós descongelação de cães férteis e subférteis.
- Avaliar a taxa de peroxidação lipídica e as concentrações de antioxidantes no plasma seminal de cães férteis e subférteis
- Verificar os efeitos da suplementação oral com antioxidantes na taxa de peroxidação lipídica e nas concentrações de antioxidantes no plasma seminal de cães férteis e subférteis.

4. Hipóteses

- A adição de antioxidantes no meio diluente de congelação dos cães subférteis promove uma melhora nos parâmetros espermáticos pós descongelação
- A suplementação por via oral de vitamina C e E diminui o estresse oxidativo, melhorando os parâmetros espermáticos pós descongelação de cães subférteis
- A associação de suplementação oral com antioxidantes e sua adição no meio diluente aumenta os parâmetros espermáticos pós descongelação

5. Material e Métodos

Delineamento experimental:

Após a coleta e análise de motilidade, vigor e concentração espermática, o sêmen foi dividido em sete alíquotas iguais, cada uma delas foi diluída no meio controle sem glicerol usando a diluição de 1:1. As alíquotas foram centrifugadas a 800g por 15 minutos (CUNHA e LOPES, 1999).

Após a centrifugação, os sobrenadantes foram dispensados e os *pellets* ressuspendido em meio (**Controle, G1, G2, G3, G4, G5, G6**).

O volume adicionado dos meios foi estabelecido após a análise da concentração espermática inicial, de modo a se obter uma diluição final de 30×10^6 espermatozoides/por mL. O sêmen diluído foi envasado em palhetas francesas de 0,5 mL, contendo portanto, 15×10^6 espermatozoides móveis por palheta.

As palhetas foram levadas até o refrigerador programado a 5°C (MINITUB) por 60 minutos. Após este período foram transferidas para uma caixa de isopor, contendo 4 cm de nitrogênio líquido, posicionadas de forma a permanecerem numa distância de 6 cm da superfície do nitrogênio (PEÑA, 1997), por 20 minutos; em seguida foram mergulhadas em nitrogênio líquido (-196°C) e armazenadas em botijões criogênicos.

Este procedimento foi repetido após 30 e 60 dias da suplementação por via oral com as vitaminas C e E.

As amostras foram descongeladas a uma temperatura de 70°C por 8 segundo PEÑA e LINDE-FORSBERG (2000), sendo então realizadas as análises de motilidade espermática (análise computadorizada), integridade de membrana e patologia espermática, assim como para a análise de estresse oxidativo e das enzimas antioxidantes.

Material e Métodos

Este presente trabalho foi aprovado sem restrições pela Câmara de Ética em Experimentação Animal – CEEA - da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP Campus de Botucatu, sob o número 62/2007. Esta aprovação é de fundamental importância, pois fiscaliza a execução e a ética dos experimentos, além de garantir o bem-estar dos animais envolvidos.

Local:

A colheita de sêmen foi realizada no canil da Polícia Militar de Bauru, SP, e na residência dos animais provenientes de propriedade particular.

A congelação, descongelação de sêmen e as avaliações seminais foram realizadas no Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Laboratório de Reprodução de Pequenos Animais e Silvestres (REPAS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” de Botucatu, estado de São Paulo (UNESP – Botucatu),

As avaliações de estresse oxidativo, das enzimas antioxidantes e das vitaminas C e E foram realizadas no Laboratório de Nutrologia e Doenças Metabólicas do Departamento de Clínica Médica, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, São Paulo.

Animais:

Foram utilizados treze (n=13) animais, sendo nove provenientes do canil da Polícia Militar de Bauru e quatro de propriedades particulares da cidade de Botucatu. Para seleção dos doadores foi realizada uma avaliação clínica prévia e exame andrológico; só participaram do experimento, aqueles animais que apresentaram um bom escore corporal e se encontravam livres de doenças infecto-contagiosas. Todos os animais foram alimentados com ração comercial (Maxi Adulto – Royal Canin) por quatro meses, sendo dois meses antes do início do experimento e dois meses após.

Cada animal foi submetido a 04 colheitas de sêmen prévias para determinação de uma média das variáveis motilidade, vigor, concentração e morfologia espermática. Baseado nestas médias, os animais foram divididos em dois grupos: **Cães férteis**: (n=7) As médias necessariamente deveriam estar dentro dos padrões recomendados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal

Material e Métodos

(CBRA, 1998). **Cães subférteis:** (n=6) Médias do ejaculado apresentavam-se abaixo do padrão recomendado pelo CBRA, com baixa concentração espermática ($< 20 \times 10^6$ spz/mL) e/ ou alto índice de patologias espermáticas ($> 30\%$).

Figura 1: Quadro demonstrativo dos animais dos grupos experimentais. Raça, idade, média dos valores obtidos para Concentração: concentração espermática (espermatozóides/mL), Morfologia: morfologia espermática, expressa em percentual de espermatozóides com morfologia normal, Grupo: grupo ao qual o animal pertencia.

Raça do animal	Idade	Concentração	Morfologia	Grupo
Beagle	2 anos	795	92	Fértil
Labrador	2 anos	290	82	Fértil
Labrador	7 anos	260	86	Fértil
Pastor Alemão	3 anos	56	84	Fértil
Pastor Alemão	2 anos	350	90	Fértil
Boxer	7 anos	177	86	Fértil
SRD	2 anos	383	93	Fértil
Rottweiler	7 anos	19	54	Subfértil
Pastor Alemão	2 anos	14,5	53	Subfértil
Labrador	3 anos	230	32	Subfértil
Labrador	3 anos	250	54	Subfértil
Labrador	2 anos	260	33	Subfértil
Labrador	2 anos	45	21	Subfértil

Colheita de Sêmen e análise *microscópica do sêmen pré congelação* :

A colheita foi realizada método de estimulação peniana descrito por Feldman e Nelson (2004). Com a finalidade de diminuir os riscos de ferimentos, todo o material utilizado neste procedimento foi de plástico.

Motilidade e vigor espermático: As avaliações foram realizadas segundo método descrito por Feldman e Nelson (2004), onde uma gota de sêmen foi colocada sobre lâmina aquecida (38-40°C) e recoberta por lamínula. O exame foi realizado com o auxílio de um microscópio de contraste de fase (Leica DME) e o

Material e Métodos

resultado obtido expresso em porcentagem (0-100) para a motilidade e através de um escore de zero a cinco (0-5) para o vigor (CBRA, 1998).

Concentração espermática: Foi determinada através de contagem das células em Câmara de Neubauer, após diluição de 1:20 em água. e o resultado expresso em número de espermatozóides por mL(sptz/mL).

Morfologia espermática: Foram confeccionados esfregaços de sêmen em lâmina limpa, fixados em solução salina aquecida a 37°C durante 10 minutos, e posterior coloração com o Karras modificado por Papa (1989). Após a coloração, os esfregaços foram avaliados em microscopia de luz com aumento de 1000x. Foram avaliadas 200 células espermáticas em cada esfregaço e classificadas de acordo com o Manual para Avaliação Andrológica do CBRA (CBRA, 1998).

Experimento I - Efeito da adição de antioxidantes no meio diluente de congelação de cães férteis e subférteis e análise do estresse oxidativo e antioxidantes no plasma seminal.

Os dois grupos considerados acima (férteis e subférteis) foram submetidos à congelação de sêmen com um diluidor controle (sem antioxidante) e com os diluidores acrescidos de antioxidante: Após a colheita e análises, o sêmen foi diluído (1:1) em meio TRIS/gema de ovo sem glicerol, sendo centrifugado por 15 minutos a 800g e novamente diluído nos meios testes, formando os subgrupos descritos abaixo.

- **Meio Controle:** composto de 3g de TRIS; 1,7g de Ácido Cítrico; 1,25g de Frutose; 0,020g de Sulfato de Amicacina; 8mL de Glicerol; 20mL de Gema de Ovo; e 72mL de Água Destilada
- **G1:** meio controle acrescido de 800 U/mL de Superóxido Dismutase (Sigma S5395)
- **G2:** meio controle acrescido de 300 U/mL de catalase (Sigma C9322)
- **G3:** meio controle acrescido de 1mM de vitamina C (Sigma A0278)
- **G4:** meio controle acrescido 600µg/mL de vitamina E (Sigma 238813)
- **G5:** meio controle acrescido de 300 U/mL de catalase (Sigma C9322) e de 800 U/mL de Superóxido Dismutase (Sigma S5395).

- **G6:** meio controle acrescido de 1mM de vitamina C (Sigma A0278) e 600µg de vitamina E (Sigma 238813)

➤ ***Análise microscópica do sêmen pós congelação:***

Análise computadorizada de sêmen - (Hamilton Thorn Biosciences version IVOS 12, Sperm Analysis System), em câmara de MAKLER aquecida a 37°C. O aparelho foi ajustado para os valores: *frames per sec:*60Hz, *number of frame:* 50, *minimum contrast:* 40, *minimum cell size:* 4 pix, *progressive cells VAP* = 60 µm/s, STR: 70%; slow cells: VAP *cutoff:* 30µm/s, VSL *cutoff:* 6.0µm/s.

Foram avaliados as seguintes variáveis da motilidade espermática: motilidade total (MT), motilidade progressiva total (MP), velocidade de trajeto (VAP), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL). Para as avaliações, uma gota de sêmen foi colocada em câmara de Makler (HTMA) aquecida e analisada à temperatura de 38°C. Para cada amostra de sêmen, três campos foram escolhidos aleatoriamente, avaliados e a sua média foi anotada.

Integridade de Membranas: Seguindo o protocolo descrito por Peña et al., (1999). Uma alíquota de 200µL de sêmen foi adicionada a 45µL de FITC-PSA e 15µL de iodeto de propídio (IP), sendo então mantidos a 39°C por 15 minutos. Em seguida uma amostra de 80µL foi retirada e adicionada a 240 µL de uma solução de citrato de sódio a 3%. Foram contadas 200 células sob microscopia de epifluorescência (NIKON – Episcopic Fluorescence Attachment “EFA” HalogenLamp Set) com aumento de 1000x. Esta análise permite a divisão espermática em quatro classes:

- Membrana acrossomal lesada e a membrana plasmática intacta (PSA⁺IP⁻)
- Membrana acrossomal lesada e a membrana plasmática lesada (PSA⁺IP⁺)
- Membrana acrossomal intacta e a membrana plasmática intacta (PSA⁻IP⁻)
- Membrana acrossomal intacta e a membrana plasmática lesada (PSA⁻IP⁺)

➤ **Avaliação de estresse oxidativo**

Taxa de peroxidação lipídica: Para a taxa de peroxidação lipídica seguiu-se o protocolo descrito por Buege e Aust (1978). Este método se baseia na reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico com uma de malondialdeído (MDA), produzindo um complexo de coloração rósea que pode ser quantificado através de leitura em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 532nm. Esta reação ocorre em pH ácido e em temperaturas entre 90 e 100°C.

Uma alíquota de 100 µL de plasma seminal foi misturada a 200 µL de uma solução de ácido tricloroacético (15%) - ácido tiobarbitúrico (0,375%) - ácido clorídrico (0,25N). Aquecido por 15 minutos em água fervente e resfriado em água, centrifugado por 10 minutos 1308g

O sobrenadante foi utilizado para quantificar os TBARs em espectrofotômetro (SpectraMax M5, Molecular Devices) em um comprimento de onda de 532nm. Os resultados obtidos foram comparados com uma curva padrão de MDA. A concentração dos TBARs foi determinada utilizando-se $1,56 \times 10^5 \times M^{-1}mL^{-1}$ como coeficiente de extinção molar de MDA. A peroxidação lipídica no plasma seminal é expressa em ng de TBARs/mL de plasma.

Antioxidantes:

Catalase: Foi determinada com comprimento de onda de 230nm a 30°C, avaliando-se o consumo de H₂O₂ por 8 minutos (BUETKER, 1975). O meio de reação continha 10µL de plasma seminal, tampão Trisaminometano/EDTA (concentração final de 50nM e 250nM respectivamente), pH 8,0 e 900µM de H₂O₂ (concentração final de 9,0nM).

Os cálculos usam o valor $0,071M^{-1}cm^{-1}$ como coeficiente de extinção molar do H₂O₂. A concentração de catalase foi expressa por ng/mL de plasma seminal.

Superóxido dismutase (SOD): foi medida indiretamente através do índice de inibição da SOD. Para isso, foi utilizado o kit comercial para dosagem de frutosamina (Labtest), esta é uma proteína que é consumida pela SOD. Assim foi mensurada a concentração de frutosamina no plasma seminal, sem inibir e inibindo a ação da SOD. realizada em três tempos. A análise foi realizada em espectrofotômetro (SpectraMax M5, Molecular Devices) utilizando um

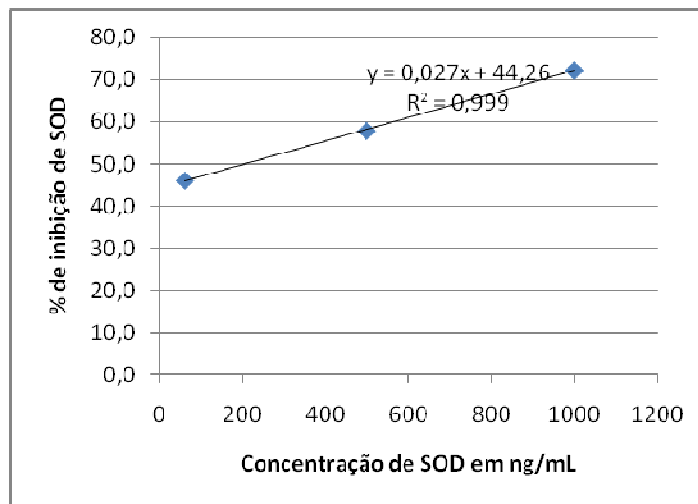
Material e Métodos

comprimento de onda de 530nm, após incubação a 37°C por 10 minutos e depois realizada duas novas análises, uma após 5 e outra após 10 minutos.

Os valores foram determinados após leitura da absorbância das amostras em três tempos diferentes, após 10 (A1) e 15 (A2) minutos de incubação a 37°C, utilizou-se o comprimento de onda de 530nm. Os resultados de A1 foram subtraídos de A2. Os resultados obtidos sem a inibição da SOD foram considerados como 100% e através de uma regra de três obteve-se o valor, em porcentagem, com a inibição da SOD.

O radical superóxido é produzido pela redução um único elétron do oxigênio molecular. Esse radical tem propriedade de redução e oxidação, embora no pH do ensaio da frutossamina, o radical é predominantemente redutor. O radical tem meia vida curta, mas pode ser analisada pela sua capacidade de reduzir substâncias que tem sua coloração alterada, como o nitroblue tetrazolium (NBT), na presença ou ausência de SOD. A formação da NBT reduzida diminui com o aumento da concentração da SOD. A SOD catalisa a dismutação do anion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, tendo maior capacidade enzimática em pH alcalino. A capacidade redutora pode ser inibida pela SOD e é atribuída ao radical superóxido, sendo este princípio usado em ensaios para mensuração da SOD. Somani et al. (1999) descreveram que a adição de 2M de HCl na amostra e incubação a 37C por 10minutos eliminam o efeito da SOD na análise de frutossamina.

Para a determinação do valor da SOD, foi realizada uma curva padrão, utilizando-se concentrações pré determinadas de SOD, chegando-se a equação: $y = 0,027x + 44,26$. Onde y é a concentração de SOD em ng/mL e x o valor encontrado na porcentagem de inibição da SOD.

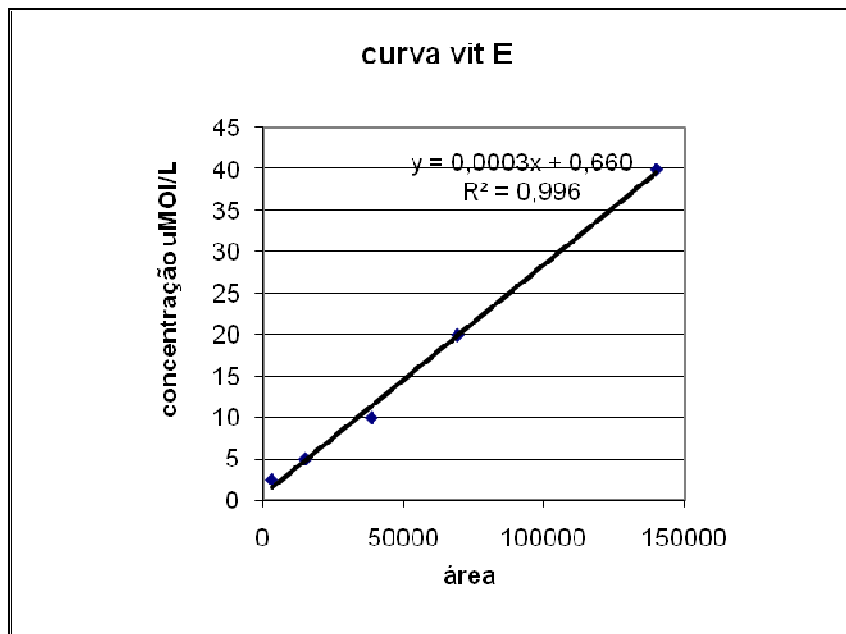


Vitamina E: Uma alíquota de 200 μ L de plasma seminal foi adicionado a 100 μ L de etanol 100% com BHT e 100 μ L de NaOH. Homogeneizado em vortex por 5 segundos. Sendo então adicionado 400 μ L de n-hexano. Agitado por 2 minutos. Centrifugados a 700 g por 5 minutos. Após a centrifugação, cada amostra foi inserida em um novo tubo de ensaio contendo 200 μ L da fase hexânica.

As amostras foram secas em fluxo de nitrogênio e ressuspendidas com 200 μ L de fase móvel. Vinte microlitros deste preparado foi injetado no aparelho de cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Sendo analisado com um comprimento de onda de excitação e emissão de 292 e 330nm, respectivamente.

Para quantificar o valor de vitamina E, 5 injeções do padrão interno (vitamina E em 5 diferentes concentrações: 2,5; 5; 10; 20 e 40 μ Mol/L) foram injetados no aparelho para definir tempo de retenção e área média obtida. Sendo então obtida a curva padrão, esta curva fornece uma equação, onde se coloca os valores obtidos na área da amostra e se obtém os valores expressos em μ Mol/L.

Na nossa análise, obteve-se a seguinte curva:



Vitamina C: Seguiu-se o protocolo proposto por Bessey (1960): Adicionou-se 400μL de ácido tricloroacético (5%) a 100μL de plasma seminal. Centrifugação refrigerada, por 10 minutos a 908g, retirou-se 60μL do sobrenadante para um tubo de ensaio e adicionou-se 20μL do reagente de cor (DTC – dinitrofenilhidrazina+tiouréia+sulfato de cobre). Este procedimento foi realizado em triplicata. Após 4 horas de reação em banho de água a 37 °C adicionou-se 100μL de H₂SO₄ 65%. A leitura foi realizada após 20 minutos em espectrofotômetro (SpectraMax M5, Molecular Devices), utilizando um comprimento de onda de 520 nm. A concentração de vitamina C é realizada por meio de uma curva de calibração.

Experimento II - Comparar os resultados da congelação do sêmen de cães férteis e subférteis suplementados com substâncias antioxidantes, por via oral.

O experimento II foi realizado na seqüência do experimento I. Os cães, bem como, os grupos (férteis e subférteis) foram exatamente os mesmos do experimento I.

Nesse experimento, os 13 animais, receberam suplementação, via oral, de 500mg / animal de vitamina C e 500mg /animal de vitamina E, adicionados na

Material e Métodos

ração, uma vez ao dia, durante 60 dias. Todos os animais receberam a mesma ração.

Trinta e sessenta dias após o início da suplementação, novas coletas de sêmen foram realizadas, analisadas e congeladas, com o meio base e os meios acrescidos de antioxidantes (**Controle, G1, G2, G3, G4, G5, G6**) conforme explicitado no experimento I.

Como são os mesmos animais, o resultado da análise seminal pós-colheita e pós-descongelação em todos os grupos realizados no experimento I, foram utilizados nesse experimento para comparação.

Análise estatística:

Experimento I:

Análise dentro de cada grupo (fértil e subfértil). Foi utilizado o teste de Friedman para comparar os diluentes, pois as condições para teste paramétrico não foram atendidas.

Para a análise entre os grupos, utilizou-se o teste de MannWithney

Experimento II:

A análise estatística utilizada para cada momento foi:

Anova paramétrica ou Friedmam para comparar os diluentes em cada grupo (fértil e não fértil). Usou-se Friedmam quando as condições para o teste paramétrico não foram satisfeitas.

Teste t ou MannWithney para comparar os dois grupos para cada diluente utilizado. Usou-se Mann Withney quando as condições para o teste paramétrico não foram satisfeitas.

6. Resultados do experimento I

Experimento I: Efeito da adição de antioxidantes no meio diluente de congelação de cães férteis e subférteis e análise do estresse oxidativo e antioxidantes no plasma seminal.

➤ *Análise microscópica do sêmen pós congelação*

Análise computadorizada do sêmen

Tabela 1: Média \pm desvio padrão dos resultados de motilidade total (**MT - %**) do espermatozóide pós descongelação dos grupos analisados: Fértil e Subfértil, em cada subgrupo: **Controle**, **G1:** Adição de SOD, **G2:** Adição de Catalase, **G3:** Adição de Vitamina C, **G4:** Adição de Vitamina E, **G5:** associação de SOD e Catalase, **G6:** associação de Vitamina C e E. Botucatu, 2010.

Grupo Subgrupo	Fértil	Subfértil	p
Controle	28,57 \pm 15,50	30,17 \pm 13,99 ^B	0,945
G1	24,57 \pm 12,54	25,17 \pm 14,50 ^{AB}	0,836
G2	30,57 \pm 26,48	36,83 \pm 36,22 ^{AB}	0,731
G3	19,43 \pm 13,11	17,67 \pm 17,10 ^{AB}	0,138
G4	26,00 \pm 20,43	11,00 \pm 7,67 ^{AB}	0,945
G5	13,71 \pm 11,38	17,67 \pm 15,74 ^{AB}	0,073
G6	22,57 \pm 21,56	7,83 \pm 9,75 ^A	0,836
p	0,334	0,033	

Letras diferentes na mesma coluna significam diferença estatística ($p < 0,05$)

Não houve diferença significativa entre os grupos. No grupo subfértil verificou-se que o controle foi superior ao G6; os demais subgrupos apresentaram resultados semelhantes.

Resultados do experimento I

Tabela 2: Média \pm desvio padrão dos resultados de motilidade progressiva (**MP** - %) do espermatozóide pós descongelação dos grupos analisados: Fértil e Subfértil, em cada subgrupo: **Controle**, **G1**: Adição de SOD, **G2**: Adição de Catalase, **G3**: Adição de Vitamina C, **G4**: Adição de Vitamina E, **G5**: associação de SOD e Catalase, **G6**: associação de Vitamina C e E. Botucatu, 2010.

Subgrupo \ Grupo	Fértil	Subfértil	P
CONTROLE	13,14 \pm 4,91	11,17 \pm 7,68	0,534
G1	12,86 \pm 5,61	13,17 \pm 7,14	0,932
G2	15,86 \pm 8,59	14,83 \pm 12,27	0,731
G3	13,00 \pm 12,49	3,83 \pm 2,32	0,101
G4	14,71 \pm 13,35	5,17 \pm 5,12	0,073
G5	9,43 \pm 9,11	7,50 \pm 7,48	0,628
G6	15,71 \pm 17,19 ^a	3,50 \pm 5,75 ^b	0,022
p	0,553	0,052	

Letras diferentes na mesma linha significam diferença estatística ($p < 0,05$)

Entre os grupos, houve diferença significativa em G6, onde o grupo fértil foi superior aos do grupo subfértil. Não houve diferença significativa entre os subgrupos.

Tabela 3: Média \pm desvio padrão dos resultados da análise da velocidade do trajeto do espermatozóide (**VAP** - $\mu\text{m/s}$) pós descongelação dos grupos analisados: Fértil e Subfértil, em cada subgrupo: **Controle**, **G1**: Adição de SOD, **G2**: Adição de Catalase, **G3**: Adição de Vitamina C, **G4**: Adição de Vitamina E, **G5**: associação de SOD e Catalase, **G6**: associação de Vitamina C e E. Botucatu 2010.

Subgrupo \ Grupo	Fértil	Subfértil	p
CONTROLE	67,83 \pm 10,29	70,00 \pm 8,89	0,102
G1	76,80 \pm 7,99	72,68 \pm 12,45	
G2	77,97 \pm 4,13	71,47 \pm 7,09	
G3	75,66 \pm 16,53	65,25 \pm 5,99	
G4	79,93 \pm 14,65 ^a	63,23 \pm 6,15 ^b	
G5	75,99 \pm 12,14	78,48 \pm 19,69	
G6	80,04 \pm 10,96 ^a	61,30 \pm 18,05 ^b	
p	0,355		0,049

Letras diferentes na mesma linha significam diferença estatística ($p < 0,05$)

Resultados do experimento I

Não houve diferença significativa entre os grupos e subgrupos. Houve interação significativa entre grupos e subgrupos, onde se verificou diferença significativa em G4 e G6, com superioridade do grupo fértil.

Tabela 4: Média \pm desvio padrão dos resultados de velocidade progressiva do espermatozóide (**VSL - $\mu\text{m/s}$**) pós descongelação dos grupos analisados (Fértil e Subfértil) em cada subgrupo (**Controle**, **G1**: Adição de SOD, **G2**: Adição de Catalase, **G3**: Adição de Vitamina C, **G4**: Adição de Vitamina E, **G5**: Adição da associação de SOD e Catalase, **G6**: Adição da associação de Vitamina C e E) Botucatu 2010.

Grupo Subgrupo	Fértil	Subfértil	p
CONTROLE	59,76 \pm 8,13	60,10 \pm 8,70	0,073
G1	68,56 \pm 7,16	63,40 \pm 11,40	
G2	68,03 \pm 3,71	62,67 \pm 8,97	
G3	70,53 \pm 13,76	59,17 \pm 5,75	
G4	72,06 \pm 12,20	53,35 \pm 12,02	
G5	67,00 \pm 13,18	68,30 \pm 15,51	
G6	70,37 \pm 9,50	55,05 \pm 18,73	
p	0,589		0,053

Não houve diferença entre os grupos e entre os subgrupos. Não houve interação entre os grupos e subgrupos.

Resultados do experimento I

Tabela 5: Média \pm desvio padrão dos resultados de velocidade curvilínea do espermatozóide (**VCL - $\mu\text{m/s}$**) pós descongelação dos grupos analisados (Fértil e Subfértil) em cada subgrupo (**Controle**, **G1**: Adição de SOD, **G2**: Adição de Catalase, **G3**: Adição de Vitamina C, **G4**: Adição de Vitamina E, **G5**: Adição da associação de SOD e Catalase, **G6**: Adição da associação de Vitamina C e E) Botucatu 2010

Grupo Subgrupo	Fértil	Subfértil	p
CONTROLE	102,50 \pm 16,50 ^{Aa}	105,87 \pm 10,86 ^{ABa}	0,263
G1	104,59 \pm 12,51 ^{Aa}	105,75 \pm 19,16 ^{ABa}	
G2	117,64 \pm 7,60 ^{Aa}	103,82 \pm 12,31 ^{ABa}	
G3	116,61 \pm 27,84 ^{Aa}	98,32 \pm 13,42 ^{Bb}	
G4	117,04 \pm 28,31 ^{Aa}	97,70 \pm 11,14 ^{Bb}	
G5	112,06 \pm 19,98 ^{Aa}	126,77 \pm 28,73 ^{Aa}	
G6	117,83 \pm 15,66 ^{Aa}	92,93 \pm 15,84 ^{Bb}	
p	0,152		0,009

Letras minúsculas diferentes na mesma linha significam diferença estatística ($p < 0,05$)

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna significam diferença estatística ($p < 0,05$)

Não houve diferença significativa entre os grupos e entre os subgrupos. Porém, foi observada uma interação significativa entre os grupos e subgrupos. Verificou-se diferença significativa entre os subgrupos G3, G4 e G6. O grupo fértil foi superior ao grupo subfértil.

Tabela 6: Média \pm desvio padrão dos resultados de espermatozoides com movimento rápido (RAP, %), pós descongelação dos grupos analisados: Fértil e Subfértil, em cada subgrupo: **Controle**, **G1**: Adição de SOD, **G2**: Adição de Catalase, **G3**: Adição de Vitamina C, **G4**: Adição de Vitamina E, **G5**: associação de SOD e Catalase, **G6**: associação de Vitamina C e E. Botucatu 2010.

Grupo Subgrupo		Fértil	Subfértil	p
CONTROLE	Média	11,43 \pm 7,76	8,83 \pm 5,78 ^{AB}	0,731
G1	Média	13,43 \pm 5,80	14,00 \pm 7,40 ^A	0,836
G2	Média	17,14 \pm 9,32 ^a	6,17 \pm 3,66 ^{ABb}	0,022
G3	Média	14,00 \pm 13,11	4,17 \pm 2,93 ^B	0,073
G4	Média	16,00 \pm 15,03 ^a	5,33 \pm 4,97 ^{Bb}	0,050
G5	Média	9,86 \pm 9,74	5,83 \pm 7,39 ^B	0,366
G6	Média	17,57 \pm 20,56 ^a	3,67 \pm 6,15 ^{Bb}	0,022
p		0,603	0,025	

Letras minúsculas diferentes na mesma linha significam diferença estatística ($p < 0,05$)

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna significam diferença estatística ($p < 0,05$)

Resultados do experimento I

Verificou-se diferença significativa em G2, G4 e G5; em todos estes subgrupos o grupo fértil foi superior ao grupo subfértil.

Houve diferença no grupo subfértil. O subgrupo G1 foi superior a G3, G4, G5 e G6, mas foi semelhante ao controle e G2.

Tabela 7: Média \pm desvio padrão dos resultados de espermatozoides com a membrana acrossomal e plasmática integras, (%) pós descongelação dos grupos analisados: Fértil e Subfértil, em cada subgrupo: **Controle**, **G1**: Adição de SOD, **G2**: Adição de Catalase, **G3**: Adição de Vitamina C, **G4**: Adição de Vitamina E, **G5**: associação de SOD e Catalase, **G6**: associação de Vitamina C e E. Botucatu 2010.

Grupo / Subgrupo	Fértil	Subfértil	P
CONTROLE	20,00 \pm 5,80	25,33 \pm 9,33	0,295
G1	21,43 \pm 3,95	23,50 \pm 10,91	0,534
G2	27,29 \pm 8,96	26,17 \pm 11,23	0,731
G3	18,71 \pm 7,02	25,50 \pm 16,29	0,628
G4	20,29 \pm 7,34	22,50 \pm 7,92	0,628
G5	21,71 \pm 9,43	23,50 \pm 8,96	0,836
G6	21,57 \pm 12,18	17,00 \pm 8,41	0,731
p	0,781	0,715	

Não houve diferença significativa entre os grupos e entre subgrupos.

➤ **Avaliação de estresse oxidativo**

Taxa de peroxidação lipídica

Tabela 8: Média \pm desvio padrão dos resultados de concentração de MDA no plasma seminal dos animais pertencentes aos grupos analisados: Fértil e Subfértil. Botucatu 2010.

Grupo	Concentração de MDA (ng/mL)
Fértil	735,20 \pm 153,80 ^A
Subfértil	507,96 \pm 161,13 ^B
p	0,041

Letras diferentes significam diferença estatística ($p < 0,05$)

Houve diferença significativa entre os grupos. O grupo fértil foi superior ao grupo subfértil.

*Resultados do experimento I***Antioxidantes****Catalase**

Não foi detectada uma concentração suficiente para a leitura de catalase no plasma seminal dos animais avaliados neste experimento.

Superóxido Dismutase

Tabela 9: Média \pm desvio padrão nos resultados de concentração de Superóxido Dismutase (SOD) no plasma seminal dos animais pertencentes aos grupos: Fértil e Subfértil. Botucatu, 2010.

Grupo	Concentração de SOD (U/mL)
Fértil	1303,93 \pm 595,33
Subfértil	1292,90 \pm 322,74
p	1,000

Não houve diferença significativa entre os grupos para a concentração de SOD no plasma seminal dos cães.

Vitamina E

Tabela 10: Média \pm desvio padrão dos resultados obtidos da concentração de vitamina E (uMol/L) no plasma seminal dos animais pertencentes aos grupos: Fértil e Subfértil. Botucatu, 2010.

Grupo	Concentração de vitamina E uMol/L
Fértil	12,63 \pm 6,43
Subfértil	11,85 \pm 5,81
p	0,836

Não houve diferença significativa entre os grupos para a concentração de vitamina E no plasma seminal dos cães do experimento.

Vitamina C

Tabela 11: Média \pm desvio padrão obtidos da concentração de vitamina C (micromol/mL) no plasma seminal dos animais pertencentes aos grupos (Fértil e Subfértil)

Grupo	Concentração de vitamina C (micromol/mL)
Fértil	106,40 \pm 25,97
Subfértil	133,58 \pm 58,78
p	0,589

Resultados do experimento I

Não houve diferença significativa entre os grupos para a concentração de vitamina C no plasma seminal dos cães do experimento.

Em relação a avaliação do estresse oxidativo, o grupo de cães férteis apresentou maior concentração de MDA no plasma seminal em relação aos subférteis. Quanto aos antioxidantes no plasma seminal de cães férteis e subférteis não houve diferença entre os grupos.

7. Discussão experimento I

O grupo fértil não sofreu influência da adição de antioxidantes no meio diluente, uma vez que nenhuma diferença significativa foi verificada entre os subgrupos nas variáveis analisadas. A concentração usada dos antioxidantes pode não ter sido suficiente para fornecer uma proteção adicional as membranas espermáticas ou a manutenção da motilidade espermática pós descongelação.

Considerando o grupo de animais férteis, Chirinéa (2004) e Hatamoto (2004) observaram valores mais altos de motilidade espermática pós descongelação (61% vs 59,54 vs 28,57%). As diferenças observadas podem ter sido ocasionadas pelas metodologia utilizada na análise de motilidade espermática; os autores utilizaram uma análise subjetiva, enquanto no presente experimento foi utilizado o CASA, uma forma mais segura e sensível de avaliação da cinética espermática. A concentração utilizada no presente experimento foi de apenas 15×10^6 espermatozoides por palheta, o que pode ter causado o chamado “efeito diluição”. Este efeito ocorre quando há uma diluição excessiva, o que pode levar a uma perda irreversível da motilidade, do metabolismo e da capacidade fertilizante do espermatozoide (MANN, 1964). Outra possibilidade é que o sistema CASA subestime os valores de motilidade em amostra diluída (RIJSSELAERE et al., 2003). Outro fator a ser considerado é que os índices de TBARS encontrados neste experimento foram superiores aos de Hatamoto (2004) em cães da raça Rottweiler (735,20 vs 293,24 ng/mL) o que pode reforçar os baixos resultados de motilidade espermática. Um alto índice de estresse oxidativo já foi relatado no ejaculado de homens com baixa motilidade espermática (KAO et al., 2008).

No subgrupo G1 (adição de SOD) não houve diferença significativa entre os grupos, entretanto, no grupo subfértil G1, foi igual a G2 (adição de catalase) e ao controle, e superiores aos demais, referente ao percentual de espermatozoides rápidos (RAP), demonstrando que o peróxido de hidrogênio não prejudicou o percentual de espermatozoides rápidos da amostra, uma vez que a maior parte da geração de peróxido de hidrogênio vem da ação da SOD

Discussão do experimento I

contra o radical peróxido, produzido pelo espermatozóide (ALVAREZ e STOREY, 1989).

No sêmen de bovino criopreservado com meio TRIS/gema de ovo observou-se que o peróxido de hidrogênio é a maior ROS responsável pela diminuição da motilidade espermática. Assim a adição de SOD ao meio de congelação não demonstrou efeito benéfico. Já com a adição de catalase houve melhora na motilidade espermática (BILODEAU et al., 2002). Em experimento com sêmen de eqüinos, Baumber e colaboradores (2000) observaram que espermatozoides incubados com um sistema gerador ROS, a adição de catalase auxiliou na manutenção da motilidade espermática. O mesmo não foi observado com a adição de SOD.

Na presente pesquisa, o subgrupo G2 (adição de catalase), não apresentou diferença significativa quando comparado com o subgrupo controle, em relação aos valores de motilidade e integridade de membrana plasmática do espermatozóide. Michael e colaboradores (2007) utilizando o mesmo meio de congelação acrescido de Catalase (300U/mL) observaram superioridade deste meio em relação ao controle. Talvez esta discordância seja devida a diferença de concentração espermática por palhetas (15×10^6 vs $66,66 \times 10^6$ espermatozoides), o que levaria a uma maior proporção de antioxidante por amostra de sêmen. Maia e colaboradores (2009) não observaram benefício na adição de catalase em nenhum dos parâmetros de motilidade espermática analisados (MT, MP, VSL, VCL, RAP) do sêmen descongelado de ovinos. Mas, observaram que o meio acrescido de catalase proporcionou uma maior proteção a membrana plasmática. Os autores atribuíram esta proteção ao fato de que a catalase remove o H_2O_2 do meio, prevenindo assim a capacitação e reação de acrossoma prematuras, que ocasionam a morte espermática.

A adição de 1,0 mM de vitamina C no meio diluente de congelação, não apresentou benefícios na pós descongelação do sêmen dos animais estudados. Monteiro e colaboradores (2009) trabalhando com concentrações de vitamina C (0, 50 e $250\mu M$) no meio diluente de congelação de sêmen cães, observaram melhora na motilidade espermática pós descongelação (62,3% vs

Discussão do experimento I

72% e 72%, $p < 0,05$). Utilizando concentração superior (1,5mM), Michael e colaboradores (2007) não observaram diferença significativa em nenhum dos parâmetros avaliados. A adição de concentrações altas de vitamina C (6,8; 13,0 e 27,0 mM) foram prejudiciais a motilidade espermática e integridade de membranas espermáticas pós descongelação em sêmen de cães. (EULENBERGER et al., 2009). Assim, acredita-se que a concentração de vitamina C utilizada em nosso experimento seja intermediária entre o seu potencial antioxidante e pró-oxidante, desta maneira não interferindo nos resultados.

A adição de 6 mM de vitamina C no meio diluente diminuiu a produção de radicais livres e aumentou a qualidade do sêmen bovino pós descongelação em relação a motilidade espermática e ao número de espermatozóides com membrana plasmática intacta. A concentração de 8,5mg/mL de ácido ascórbico no meio diluente, ao contrário, resultou em efeito deletério sobre o sêmen bovino (ZAN et al., 2008).

Michael e colaboradores (2007) utilizaram uma concentração menor de Vitamina E (0,3mM) no meio de congelação e não observaram diferença significativa na motilidade total do sêmen descongelado de cães férteis quando comparado com o grupo controle confirmando os resultados obtidos no presente experimento.

Baptista Sobrinho, (2009) avaliaram a motilidade espermática, integridade de acrossoma e a concentração de TBARS em sêmen de cães utilizando a adição de três concentrações de vitamina E no meio diluente (1,0; 5,0 e 10,0 mM). Os resultados obtidos não diferiram entre si e entre o grupo controle. No presente trabalho, o meio diluente acrescido de vitamina E (G4), mostrou resultados superiores aos de Baptista Sobrinho, (2009), Desta maneira pode-se hipotetizar que a concentração de 0,6mM, utilizada no presente experimento foi mais eficaz na conservação da motilidade espermática e da membrana acrossomal pós descongelação.

A adição de Trolox (versão hidrossolúvel da vitamina E) demonstrou um efeito positivo na motilidade e no potencial de membrana mitocondrial de

Discussão do experimento I

espermatozoides de suínos, pós-descongelção. Um aumento da motilidade, viabilidade, integridade acrossomal e susceptibilidade a peroxidação lipídica do espermatozóide suíno, também foram observados quando se utilizou a versão lipossolúvel da vitamina E (α -tocoferol) (PEÑA et al., 2003).

Em experimento utilizando espermatozóide felino proveniente do epidídimo, observou-se uma melhora na motilidade total, progressiva e de integridade de membrana plasmática de espermatozóide pós descongelção, quando foi utilizado um meio diluente acrescido de 5mM de Trolox. Os autores não observaram melhora nos índices de integridade da membrana acrossomal (THUWANUT, 2007).

Na literatura consultada não foi encontrado referências utilizando cães subférteis e meios de congelação com antioxidantes, impossibilitando uma comparação efetiva de resultados.

O espermatozóide de cães subférteis foi mais sensível a vitamina E do que dos cães férteis, uma vez que nos meios acrescidos de vitamina E (G4 e G6 – vitamina E associada a vitamina C) os espermatozoides apresentaram-se mais lentos (menores valores de VAP e VCL) e com menor percentual de espermatozoides rápidos (RAP). Talvez a concentração de vitamina E usada neste experimento tenha sido prejudicial as células espermáticas de animais subférteis. Sabe-se que a vitamina E quando em altas concentrações pode apresentar um efeito oxidante (ROLF et al., 1999, HALIWELL 1999).

A vitamina E é considerada um eliminador de radicais peroxil, um dos radicais mais potentes (BENDICH et al., 1990) e que participa da fase de propagação da peroxidação lipídica (SILVA, 2006). Por isso a vitamina E é um dos únicos antioxidantes capazes de quebrar a cadeia da peroxidação lipídica (BURTON et al., 1985). Talvez o radical peroxil esteja envolvido na aquisição da velocidade espermática e que para isso seja necessário uma determinada taxa de peroxidação lipídica. Assim, o uso de vitamina E pode ter quebrado o ciclo da peroxidação lipídica, diminuindo a peroxidação e desta maneira interferindo na velocidade espermática.

Discussão do experimento I

O uso da vitamina C ou E no meio de congelação não diferiu do subgrupo controle, mas a sua associação reduziu a motilidade total da amostra, demonstrando que a interação destas duas vitaminas prejudica não só a velocidade (VAP, VCL) como a motilidade dos espermatozóides. A vitamina C tem como uma de suas propriedades o fato de reciclar a vitamina E (ROLF et al., 1999; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999), mantendo desta maneira uma alta concentração de vitamina E no meio. Talvez isto tenha causado um excesso de antioxidantes, levando a um desequilíbrio oxidantes/antioxidantes e consequentemente ao estresse oxidativo.

Neste experimento associou-se a SOD e a catalase ao meio diluente, com o intuito de que a catalase neutraliza-se a geração de peróxido de hidrogênio pela SOD, e assim aumentar as taxas de motilidade espermática e integridade de membrana. Não foi verificada diferença significativa na integridade das membranas plasmática e acrossomal. Além disto, o percentual de espermatozóides rápidos da amostra foi inferior ao observado com o meio G1, adição de SOD.

Kawakami e colaboradores (2007) também observaram que a SOD é um antioxidante mais efetivo que a catalase na manutenção da motilidade espermática dos cães. Já em espermatozóide de equino, observou-se que o peróxido de hidrogênio foi a ROS mais importante para a queda de motilidade espermática e desta maneira o uso de SOD não preveniu a queda (BAUMBER et al., 2000). Assim, aparentemente o espermatozóide de cão é mais resistente a ação do peróxido de hidrogênio do que de outras espécies. Provavelmente existem diferenças de susceptibilidade a um determinado RL/ROS entre espermatozóides de diversas espécies ou pode existir diferenças na capacidade antioxidante dos espermatozóides (BAUMBER et al., 2000).

O aumento da concentração de ROS no plasma seminal foi relatado como uma das causas da baixa qualidade do sêmen de humanos (AITKEN et al., 1989), hamster (CHEN et al., 2003) e cães (KAWAKAMI et al., 2007). Porém em nosso experimento o grupo de animais com boa qualidade espermática (grupo fértil) apresentou maiores índices de peroxidação lipídica e

Discussão do experimento I

a mesma concentração de antioxidantes do que os animais do grupo subfértil. Essa situação indica um maior índice de estresse oxidativo no plasma seminal dos animais do grupo fértil.

Uma condição importante a ser discutida é a possibilidade dessa maior concentração de TBARS observada no plasma seminal do grupo fértil ser devida a uma concentração espermática também maior nesse grupo; assim quanto maior o número de espermatozóide, maior a concentração de ROS e maior concentração de TBARS. Existe também a possibilidade de que outros antioxidantes, não mensurados neste experimento, como a glutathione peroxidase estejam em concentrações mais baixas no grupo fértil, contribuindo assim para um desequilíbrio das concentrações de oxidantes/antioxidantes. Este fato pode ser o motivo pelo qual, na maioria das variáveis analisadas, não verificou-se diferença entre os resultados na pós descongelação entre os grupos.

Em estudo realizado com homens férteis e subférteis, também foi observado, na pré-congelação, uma maior taxa de peroxidação lipídica no sêmen de homens férteis (SCHUFFER et al., 2001). Os autores concluíram que o processo de congelação/descongelação espermática não aumenta a peroxidação lipídica, mas está associado a translocação de fosfatidilserina da membrana plasmática, o que provocaria a queda na motilidade espermática.

Não foi possível detectar a concentração de catalase do plasma seminal dos animais avaliados, corroborando com os resultados de Hatamoto (2004), que também não encontraram catalase no plasma seminal de cães da raça Rottweiler. Kawakami e colaboradores (2007) detectaram a presença desta enzima no plasma seminal de cães e observaram uma concentração mais baixa em animais com ejaculado abaixo do padrão desejado do que em animais considerados férteis (0,48 x 2,18 u/mg de proteína, respectivamente). A catalase é uma enzima intracelular, por isso não deve estar presente em altas concentrações no plasma seminal (BALL et al., 2001; CALAMERA et al., 2001). Talvez o equipamento usado em nosso experimento não tenha sensibilidade suficiente para detectar pequenas concentrações de catalase.

Discussão do experimento I

Não houve diferença entre os grupos (Fértil e Subfértil) na concentração dos antioxidantes avaliados (SOD, Vitamina C e E) no plasma seminal.

Ao contrário dos resultados de Kawakami e colaboradores (2007) que relataram uma concentração de SOD significativamente mais baixa no plasma seminal de cães com problemas reprodutivos do que naqueles sem problemas reprodutivos. Estes autores correlacionaram este resultado com a baixa motilidade espermática encontrada no ejaculado daqueles animais. Em nosso experimento, os cães subférteis não apresentavam problema da motilidade espermática, mas sim de concentração e morfologia espermática. Talvez por isso não foi observado diferença na concentração de SOD entre os grupos experimentais.

Em experimento realizado em suínos, Cerolini e colaboradores, (2001) dividiram seus animais em três categorias, de acordo com as características seminais (bons, médios, ruins) e apesar das diferenças encontradas na concentração e motilidade pré congelação e pós descongelação nenhuma diferença significativa na atividade dos antioxidantes enzimáticos foi observada. Em humanos, também não observou-se diferença significativa na concentração de SOD e catalase no plasma seminal de homens normospermicos e oligospermicos (HSIEH et al., 2002).

A metodologia utilizada para a mensuração das enzimas antioxidantes e as unidades de medidas são muito variadas na literatura consultada o que dificulta a interpretação dos resultados e a realização de uma comparação segura.

Baseado no exposto, pode-se perceber que a adição de antioxidantes no meio de congelação de sêmen dos animais férteis não foi eficiente. Nos animais subférteis observou-se diferença significativa quando testou-se a adição de SOD, aumentando os valores de RAP e a associação de SOD e catalase, aumentando os valores de VCL. A adição de vitamina C, E e a sua associação, promoveu redução dos valores de MT (associação de vitamina C e E), VCL (Vitamina C e E) e RAP (vitamina C, E e associação).

8. Resultados do Experimento II

Experimento II - Efeito da suplementação com substâncias antioxidantes, por via oral e no meio diluente, sobre a congelação de sêmen de cães férteis e subférteis.

Optou-se por apresentar os resultados comparando - se inicialmente os grupos: Fértil x Subfértil (Tabela de 12 a 25) e em seguida, a comparação entre os momentos (M1 x M2 x M3) Tabela de 26 a 44.

Tabela 12: Média \pm desvio padrão dos resultados de motilidade total (**MT - %**) pós descongelação dos grupos experimentais: Fértil e Subfértil em cada subgrupo **Controle**, **G1**: Adição de SOD, **G2**: Adição de Catalase, **G3**: Adição de Vitamina C, **G4**: Adição de Vitamina E, **G5**: Adição da associação de SOD e Catalase, **G6**: Adição da associação de Vitamina C e E no **Momento 2**. Botucatu 2010

Grupo Subgrupo	Fértil	Subfértil	p
CONTROLE	7,86 \pm 5,98	21,67 \pm 21,72	0,534
G1	8,14 \pm 6,18	21,17 \pm 17,61	0,234
G2	19,43 \pm 12,93	21,67 \pm 17,78	0,945
G3	16,43 \pm 14,98	23,83 \pm 17,92	0,445
G4	9,29 \pm 8,98	23,17 \pm 7,67	0,295
G5	9,71 \pm 8,01	9,83 \pm 15,74	0,945
G6	10,14 \pm 7,10	16,33 \pm 9,75	0,731
p	0,219	0,020	

M2 – 30 dias de suplementação

Não houve diferença significativa entre os grupos. No grupo Subfértil, houve diferença entre os subgrupos, porém, pelo teste de comparação múltipla não foi possível determinar qual subgrupo foi diferente.

Resultados do experimento II

Tabela 13: Média \pm desvio padrão dos resultados de motilidade total (**MT - %**) pós descongelação dos grupos experimentais: Fértil e Subfértil em cada subgrupo **Controle**, **G1**: Adição de SOD, **G2**: Adição de Catalase, **G3**: Adição de Vitamina C, **G4**: Adição de Vitamina E, **G5**: Adição da associação de SOD e Catalase, **G6**: Adição da associação de Vitamina C e E no **Momento 3**. Botucatu, 2010

Grupo / Subgrupo	Fértil	Subfértil	p
CONTROLE	12,71 \pm 4,46 ^{AB}	20,83 \pm 15,20	0,445
G1	20,57 \pm 9,50 ^{AB}	23,67 \pm 16,82	0,945
G2	24,29 \pm 9,20 ^B	28,5 \pm 21,14	0,628
G3	22,71 \pm 7,59 ^B	30,33 \pm 21,57	0,445
G4	19,86 \pm 10,76 ^{AB}	25,33 \pm 17,21	0,628
G5	11,00 \pm 6,32 ^A	9,67 \pm 6,19	0,836
G6	21,57 \pm 7,09 ^{AB}	25,5 \pm 17,51	0,945
p	0,001	0,083	

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna significam diferença estatística M3 – 60 dias de suplementação oral com vitamina C e E

Não houve diferença entre os grupos. No grupo Fértil, G3 e G2 foram superiores a G5; os demais subgrupos foram semelhantes.

Tabela 14: Média \pm desvio padrão dos resultados de motilidade progressiva (**MP - %**) pós descongelação dos grupos experimentais: Fértil e Subfértil em cada subgrupo **Controle**, **G1**: Adição de SOD, **G2**: Adição de Catalase, **G3**: Adição de Vitamina C, **G4**: Adição de Vitamina E, **G5**: Adição da associação de SOD e Catalase, **G6**: Adição da associação de Vitamina C e E no **Momento 2**. Botucatu, 2010

Grupo / Subgrupos	Fértil	Subfértil	p
CONTROLE	3,28 \pm 2,69	12,33 \pm 13,28	0,534
G1	4,71 \pm 4,54	13,83 \pm 12,51	0,295
G2	11,71 \pm 8,36	14,83 \pm 12,89	0,628
G3	10,71 \pm 10,08	14,50 \pm 10,82	0,445
G4	5,71 \pm 6,60	16,50 \pm 17,46	0,295
G5	3,85 \pm 3,02	4,33 \pm 4,89	0,945
G6	5,85 \pm 5,55	11,83 \pm 13,91	0,731
p	0,111	0,054	

M2 – 30 dias de suplementação oral com vitamina C e E

Não houve diferença significativa entre os momentos em nenhum subgrupo.

Resultados do experimento II

Tabela 15: Média \pm desvio padrão dos resultados de motilidade progressiva (**MP** - %) pós descongelação dos grupos experimentais: Fértil e Subfértil em cada subgrupo **Controle**, **G1**: Adição de SOD, **G2**: Adição de Catalase, **G3**: Adição de Vitamina C, **G4**: Adição de Vitamina E, **G5**: Adição da associação de SOD e Catalase, **G6**: Adição da associação de Vitamina C e E **Momento 3**. Botucatu, 2010

Grupo Subgrupo	Fértil	Subfértil	p
CONTROLE	3,14 \pm 2,34 ^B	12,67 \pm 12,89 ^A	0,234
G1	9,14 \pm 4,60 ^{AB}	15,67 \pm 11,50 ^A	0,295
G2	12,71 \pm 6,34 ^A	20,0 \pm 15,72 ^B	0,534
G3	11,86 \pm 6,87 ^{AB}	23,50 \pm 17,95 ^B	0,295
G4	12,71 \pm 6,10 ^A	17,50 \pm 13,50 ^{AB}	0,534
G5	4,14 \pm 3,98 ^B	4,8 \pm 2,64 ^C	0,836
G6	12,43 \pm 5,86 ^A	18,50 \pm 13,95 ^{AB}	0,534
p	0,001	0,037	

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna significam diferença estatística
M3 – 60 dias de suplementação oral com vitamina C e E

Não houve diferença entre os grupos. No grupo Fértil, G2, G4 e G6 foram semelhantes e superiores a G5 e G6. Os demais subgrupos foram semelhantes. No grupo Subfértil: G5 foi menor que G1. G1= Controle = G4 e G6 < G2=G3=G4 = G6.

Resultados do experimento II

Tabela 16: Média \pm desvio padrão dos resultados da velocidade do trajeto do espermatozóide (**VAP** - $\mu\text{m/s}$) pós descongelamento dos grupos experimentais: Fértil e Subfértil em cada subgrupo **Controle**, **G1**: Adição de SOD, **G2**: Adição de Catalase, **G3**: Adição de Vitamina C, **G4**: Adição de Vitamina E, **G5**: Adição da associação de SOD e Catalase, **G6**: Adição da associação de Vitamina C e E no **Momento 2**. Botucatu, 2010

Grupo Subgrupo	Fértil	Subfértil	p
CONTROLE	52,81 \pm 25,36 ^A	61,13 \pm 31,32	0,366
G1	59,17 \pm 27,83 ^{AB}	62,35 \pm 33,24	0,534
G2	69,00 \pm 30,75 ^B	62,23 \pm 31,20	0,234
G3	68,71 \pm 31,87 ^B	80,15 \pm 8,25	0,534
G4	59,40 \pm 27,90 ^{AB}	64,38 \pm 32,27	0,534
G5	57,26 \pm 26,42 ^{AB}	55,30 \pm 31,17	0,945
G6	56,92 \pm 26,21 ^{AB}	55,75 \pm 30,31	0,945
p	0,036	0,181	

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna significam diferença estatística M2 – 30 dias de suplementação oral com vitamina C e E

Não houve diferença entre os grupos. No grupo Fértil, houve diferença em G2 e G3, que foram superiores ao Controle. Os demais subgrupos foram semelhantes.

Tabela 17: Média \pm desvio padrão dos resultados da velocidade do trajeto do espermatozóide (**VAP** - $\mu\text{m/s}$) pós descongelamento dos grupos experimentais: Fértil e Subfértil em cada subgrupo **Controle**, **G1**: Adição de SOD, **G2**: Adição de Catalase, **G3**: Adição de Vitamina C, **G4**: Adição de Vitamina E, **G5**: Adição da associação de SOD e Catalase, **G6**: Adição da associação de Vitamina C e E no **Momento 3**. Botucatu, 2010

Grupo Subgrupo	Fértil	Subfértil	p
CONTROLE	58,26 \pm 13,86 ^{Ba}	72,17 \pm 17,60 ^{ABb}	0,207
G1	70,44 \pm 5,64 ^{AB}	77,22 \pm 6,98 ^{AB}	
G2	69,94 \pm 8,98 ^{AB}	81,13 \pm 8,47 ^A	
G3	71,29 \pm 13,07 ^{ABa}	86,25 \pm 10,70 ^{Ab}	
G4	80,53 \pm 8,93 ^A	70,48 \pm 11,51 ^{AB}	
G5	64,93 \pm 22,85 ^B	62,40 \pm 14,09 ^B	
G6	69,80 \pm 7,56 ^{AB}	78,65 \pm 3,97 ^{AB}	
p	<0,001		0,012

Letras maiúsculas diferentes significam que os grupos são diferentes.
Letras minúsculas diferentes significam que os diluentes são diferentes
M3 – 60 dias de suplementação oral com vitamina C e E

Resultados do experimento II

Entre os grupos, não houve diferença. No grupo Fértil, G4 foi superior ao G5 e ao Controle. Os demais subgrupos foram diferentes entre si. No grupo Subfértil, G5 foi inferior a G2 e G3, os demais subgrupos foram semelhantes.

Houve interação entre grupos e subgrupos.

Tabela 18: Média \pm desvio padrão dos resultados da velocidade progressiva do espermatozóide (**VSL** - $\mu\text{m/s}$) pós descongelação dos grupos experimentais: Fértil e Subfértil em cada subgrupo **Controle**, **G1**: Adição de SOD, **G2**: Adição de Catalase, **G3**: Adição de Vitamina C, **G4**: Adição de Vitamina E, **G5**: Adição da associação de SOD e Catalase, **G6**: Adição da associação de Vitamina C e E no **Momento 2**. Botucatu, 2010

Grupo Subgrupo	Fértil	Subfértil	p
CONTROLE	54,03 \pm 28,01	45,24 \pm 22,10	0,181
G1	54,57 \pm 28,66	50,71 \pm 24,51	0,799
G2	55,32 \pm 28,13	59,20 \pm 26,40	0,628
G3	71,53 \pm 8,74	60,89 \pm 28,41	0,836
G4	56,75 \pm 29,18	51,37 \pm 24,72	0,731
G5	50,08 \pm 30,16	50,49 \pm 24,24	0,979
G6	50,80 \pm 27,97	50,31 \pm 23,69	0,945
p	0,029	0,169	

M2 – 30 dias de suplementação oral com vitamina C e E

Não houve diferença significativa entre os grupos. Houve diferença no grupo Fértil, porém, pelo teste de comparação múltipla não foi possível identificar qual subgrupo foi diferente.

Resultados do experimento II

Tabela 19: Média \pm desvio padrão dos resultados da velocidade progressiva do espermatozóide (**VSL - $\mu\text{m/s}$**) pós descongelação dos grupos experimentais: Fértil e Subfértil em cada subgrupo **Controle**, **G1**: Adição de SOD, **G2**: Adição de Catalase, **G3**: Adição de Vitamina C, **G4**: Adição de Vitamina E, **G5**: Adição da associação de SOD e Catalase, **G6**: Adição da associação de Vitamina C e E no **Momento 3**. Botucatu, 2010

	Fértil	Subfértil	p
CONTROLE	65,12 \pm 18,04 ^{Ba}	48,90 \pm 10,73 ^{ABb}	0,073
G1	66,87 \pm 6,64 ^{AB}	59,40 \pm 3,85 ^{AB}	
G2	70,82 \pm 8,42 ^{AB}	61,96 \pm 8,38 ^{AB}	
G3	78,33 \pm 9,93 ^{Aa}	63,71 \pm 10,59 ^{Ab}	
G4	64,25 \pm 9,74 ^B	72,14 \pm 9,36 ^{AB}	
G5	56,28 \pm 11,90 ^B	55,34 \pm 18,91 ^B	
G6	70,47 \pm 3,68 ^{AB}	61,89 \pm 5,53 ^{AB}	
P	<0,001		0,026

Letras maiúsculas diferentes significam que os grupos são diferentes.
M3 – 60 dias de suplementação oral com vitamina C e E

Não houve diferença significativa entre os grupos. No grupo Fértil, G3 foi superior ao Controle, a G4 e a G5, os demais subgrupos foram semelhantes. No grupo Subfértil, G3 foi superior a G5, os demais subgrupos foram semelhantes.

Houve interação significativa entre grupo e subgrupo. Os subgrupos G3 e G4 foram superiores ao Controle e G5, os demais subgrupos foram semelhantes. O grupo Fértil foi superior no Controle e G3.

Resultados do experimento II

Tabela 20: Média \pm desvio padrão dos resultados da velocidade curvilínea do espermatozóide (**VCL - $\mu\text{m/s}$**) pós descongelação dos grupos experimentais: Fértil e Subfértil em cada subgrupo **Controle**, **G1**: Adição de SOD, **G2**: Adição de Catalase, **G3**: Adição de Vitamina C, **G4**: Adição de Vitamina E, **G5**: Adição da associação de SOD e Catalase, **G6**: Adição da associação de Vitamina C e E no **Momento 2**. Botucatu, 2010.

Grupo Subgrupo	Fértil	Subfértil	p
CONTROLE	85,23 \pm 40,76	93,55 \pm 47,22	0,534
G1	96,27 \pm 44,72	87,15 \pm 46,66	0,628
G2	104,47 \pm 47,02	89,57 \pm 44,31	0,051
G3	102,83 \pm 47,74	124,73 \pm 19,10	0,628
G4	93,342 \pm 45,34	98,48 \pm 50,46	0,445
G5	89,30 \pm 40,81	84,37 \pm 41,97	0,445
G6	87,74 \pm 39,85	79,25 \pm 42,49	0,534
p	0,042	0,051	

M2 – 30 dias de suplementação oral com vitamina C e E

Não houve diferença entre os grupos. Observou-se diferença entre os subgrupos no grupo Fértil, porém não foi possível identificar pelo teste de comparação múltipla qual subgrupo foi diferente.

Tabela 21: Média \pm desvio padrão dos resultados da velocidade curvilínea do espermatozóide (**VCL - $\mu\text{m/s}$**) pós descongelação dos grupos experimentais: Fértil e Subfértil em cada subgrupo **Controle**, **G1**: Adição de SOD, **G2**: Adição de Catalase, **G3**: Adição de Vitamina C, **G4**: Adição de Vitamina E, **G5**: Adição da associação de SOD e Catalase, **G6**: Adição da associação de Vitamina C e E no **Momento 3**. Botucatu, 2010.

Grupo Subgrupo	Fértil	Subfértil	p
CONTROLE	98,66 \pm 25,22 ^A	104,90 \pm 10,11 ^{AB}	0,803
G1	108,47 \pm 11,63 ^A	91,58 \pm 38,59 ^B	
G2	103,43 \pm 16,06 ^A	115,72 \pm 11,98 ^{AB}	
G3	107,70 \pm 21,13 ^A	116,62 \pm 19,41 ^A	
G4	119,27 \pm 17,91 ^{Aa}	97,77 \pm 20,35 ^{ABb}	
G5	107,69 \pm 27,05 ^A	95,55 \pm 23,52 ^{AB}	
G6	108,29 \pm 16,05 ^A	116,40 \pm 8,92 ^{AB}	
P	0,168		0,017

M3 – 60 dias de suplementação oral com vitamina C e E

Resultados do experimento II

Não houve diferença significativa entre os grupos e subgrupos. Houve interação significativa entre grupo e subgrupo. Verificou-se diferença entre os grupos em G4, sendo o grupo Fértil superior ao Subfértil. No grupo Fértil observou-se diferença entre G1 e G4, sendo G4 superior a G1. Os demais subgrupos foram semelhantes.

Tabela 22: Média \pm desvio padrão dos resultados de espermatozoides com movimento rápido (RAP, %), pós descongelação dos grupos experimentais: Fértil e Subfértil em cada subgrupo **Controle**, **G1**: Adição de SOD, **G2**: Adição de Catalase, **G3**: Adição de Vitamina C, **G4**: Adição de Vitamina E, **G5**: Adição da associação de SOD e Catalase, **G6**: Adição da associação de Vitamina C e E no **Momento 2**. Botucatu, 2010.

Subgrupo \ Grupo	Fértil	Subfértil	p
CONTROLE	3,43 \pm 2,94	14,00 \pm 15,03 ^A	0,534
G1	5,29 \pm 4,79	15,33 \pm 13,94 ^{AB}	0,366
G2	13,29 \pm 9,52	16,50 \pm 14,25 ^{AB}	0,731
G3	10,43 \pm 11,41	17,33 \pm 14,84 ^B	0,366
G4	6,29 \pm 6,73	17,67 \pm 18,15 ^B	0,295
G5	4,29 \pm 3,86	5,00 \pm 5,29 ^C	1,000
G6	6,00 \pm 5,74	12,33 \pm 14,62 ^A	0,731
P	0,166	0,037	

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna significam diferença estatística M2 – 30 dias de suplementação oral com vitamina C e E

Não houve diferença significativa entre os grupos. No grupo subfértil, verificou-se uma superioridade de G3 e G4 em relação ao Controle e G6. Os subgrupos G1 e G2 foram semelhantes ao Controle, a G3, a G4 e a G6. G5 foi inferior a todos os outros subgrupos.

Resultados do experimento II

Tabela 23: Média \pm desvio padrão dos resultados de espermatozoides com movimento rápido (RAP, %), pós descongelação dos grupos experimentais: Fértil e Subfértil em cada subgrupo **Controle**, **G1**: Adição de SOD, **G2**: Adição de Catalase, **G3**: Adição de Vitamina C, **G4**: Adição de Vitamina E, **G5**: Adição da associação de SOD e Catalase, **G6**: Adição da associação de Vitamina C e E no **Momento 3**. Botucatu, 2010.

Subgrupo \ Grupo	Fértil	Subfértil	p
CONTROLE	3,57 \pm 2,76 ^A	13,67 \pm 14,14 ^{AB}	0,234
G1	11,14 \pm 5,93 ^B	17,50 \pm 13,19 ^{AB}	0,534
G2	13,71 \pm 6,52 ^B	22,17 \pm 17,68 ^B	0,534
G3	12,43 \pm 6,80 ^B	25,00 \pm 18,55 ^B	0,234
G4	12,86 \pm 8,76 ^B	15,67 \pm 13,57 ^{AB}	0,534
G5	5,00 \pm 5,10 ^A	4,83 \pm 2,64 ^A	0,945
G6	13,29 \pm 6,16 ^B	20,00 \pm 14,63 ^{AB}	0,731
P	0,000	0,048	

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna significam diferença estatística M3 – 60 dias de suplementação oral com vitamina C e E

Não houve diferença significativa entre os grupos. Verificou-se diferença entre os subgrupos. No grupo Fértil, G5 e Controle foram inferiores aos demais subgrupos. No grupo Subfértil, G2 e G3 foram superiores a G5. Os demais subgrupos foram semelhantes.

Tabela 24: Média \pm desvio padrão dos resultados de espermatozoides com integridade de membrana acrossomal e plasmática (%), pós descongelação dos grupos experimentais: Fértil e Subfértil em cada subgrupo **Controle**, **G1**: Adição de SOD, **G2**: Adição de Catalase, **G3**: Adição de Vitamina C, **G4**: Adição de Vitamina E, **G5**: Adição da associação de SOD e Catalase, **G6**: Adição da associação de Vitamina C e E no **Momento 2**. Botucatu, 2010

Subgrupo \ Grupo	Fértil	Subfértil	p
CONTROLE	13,71 \pm 2,69	19,00 \pm 7,16	0,181
G1	17,71 \pm 7,67	18,83 \pm 9,52	0,836
G2	19,71 \pm 11,38	14,33 \pm 8,57	0,445
G3	17,43 \pm 10,53	19,50 \pm 6,57	0,731
G4	18,57 \pm 8,30	21,17 \pm 12,02	0,731
G5	11,57 \pm 8,70	19,00 \pm 7,04	0,101
G6	12,71 \pm 5,96	15,50 \pm 3,02	0,445
P	0,230	0,261	

M2 – 30 dias de suplementação oral com vitamina C e E

Resultados do experimento II

Não houve diferença significativa entre os momentos em nenhum subgrupo.

Tabela 25: Média \pm desvio padrão dos resultados de espermatozoides com integridade de membrana acrossomal e plasmática (%), pós descongelação dos grupos experimentais: Fértil e Subfértil em cada subgrupo **Controle**, **G1**: Adição de SOD, **G2**: Adição de Catalase, **G3**: Adição de Vitamina C, **G4**: Adição de Vitamina E, **G5**: Adição da associação de SOD e Catalase, **G6**: Adição da associação de Vitamina C e E no **Momento 3**. Botucatu, 2010.

Subgrupo \ Grupo	Fértil	Subfértil	p
CONTROLE	26,43 \pm 9,74	27,83 \pm 8,18	0,731
G1	25,71 \pm 5,77	27,50 \pm 7,99	0,534
G2	22,43 \pm 5,83	24,33 \pm 8,71	0,836
G3	25,86 \pm 6,31	24,67 \pm 9,65	0,731
G4	24,86 \pm 8,99	25,67 \pm 9,63	0,836
G5	23,71 \pm 8,26	32,67 \pm 8,26	0,138
G6	28,57 \pm 10,06	26,17 \pm 10,23	0,731
p	0,492	0,392	

M3 – 60 dias de suplementação oral com vitamina C e E

Não houve diferença significativa entre os momentos em nenhum subgrupo.

Tabela 26: Média \pm desvio padrão dos resultados de motilidade total (MT - %) pós descongelação do grupo Fértil em cada subgrupo **Controle**, **G1**: Adição de SOD, **G2**: Adição de Catalase, **G3**: Adição de Vitamina C, **G4**: Adição de Vitamina E, **G5**: Adição da associação de SOD e Catalase, **G6**: Adição da associação de Vitamina C e E nos três momentos analisados: M1, M2 e M3. Botucatu, 2010.

	Momento 1	Momento 2	Momento 3	
Controle	28,57 \pm 15,50 ^a	7,86 \pm 5,98 ^b	12,71 \pm 4,46 ^b	0,007
G1	24,57 \pm 12,54	8,14 \pm 6,18	20,57 \pm 9,50	0,066
G2	30,57 \pm 26,48	19,43 \pm 12,93	24,29 \pm 9,20	0,707
G3	19,43 \pm 13,11	16,43 \pm 14,98	22,71 \pm 7,59	0,964
G4	26,00 \pm 20,43	9,29 \pm 8,98	19,86 \pm 10,76	0,163
G5	13,71 \pm 11,38	9,71 \pm 8,01	11,00 \pm 6,32	0,867
G6	22,57 \pm 21,56	10,14 \pm 7,10	21,57 \pm 7,09	0,276

Letras minúsculas diferentes na mesma linha significam diferença estatística

M1: antes da suplementação oral com vitamina C e E

M2: após 30 dias de suplementação por via oral com vitamina C e

M3 com 60 dias de suplementação por via oral com vitamina C e E

Resultados do experimento II

No subgrupo Controle, houve diferença entre os momentos: M1 foi superior a M2 e M3.

Tabela 27: Média \pm desvio padrão dos resultados de motilidade total (MT - %) pós descongelamento do grupo Subfértil em cada subgrupo (**Controle**, **G1**: Adição de SOD, **G2**: Adição de Catalase, **G3**: Adição de Vitamina C, **G4**: Adição de Vitamina E, **G5**: Adição da associação de SOD e Catalase, **G6**: Adição da associação de Vitamina C e E) nos três momentos analisados: M1, M2 e M3. Botucatu, 2010.

	Momento 1	Momento 2	Momento 3	p
Controle	30,17 \pm 13,99	21,67 \pm 21,72	20,83 \pm 15,20	0,052
G1	25,17 \pm 14,50	21,17 \pm 17,61	23,67 \pm 16,82	0,311
G2	36,83 \pm 36,22	21,67 \pm 17,78	28,50 \pm 21,14	0,309
G3	17,67 \pm 17,10	23,83 \pm 17,92	30,33 \pm 21,57	0,957
G4	11,00 \pm 7,67	23,17 \pm 21,16	25,33 \pm 17,21	0,607
G5	17,67 \pm 15,74	9,83 \pm 9,79	9,67 \pm 6,19	0,119
G6	7,83 \pm 9,75	16,33 \pm 17,85	25,50 \pm 17,51	0,840

M1: antes da suplementação oral com vitamina C e E

M2: após 30 dias de suplementação por via oral com vitamina C e

M3 com 60 dias de suplementação por via oral com vitamina C e E

Não houve diferença significativa entre os momentos em nenhum subgrupo.

Tabela 28: Média \pm desvio padrão dos resultados de motilidade progressiva (MP - %) pós descongelamento do grupo Fértil em cada subgrupo **Controle**, **G1**: Adição de SOD, **G2**: Adição de Catalase, **G3**: Adição de Vitamina C, **G4**: Adição de Vitamina E, **G5**: Adição da associação de SOD e Catalase, **G6**: Adição da associação de Vitamina C e E nos três momentos analisados: M1, M2 e M3. Botucatu, 2010.

	Momento 1	Momento 2	Momento 3	p
Controle	13,14 \pm 4,91 ^a	3,29 \pm 2,69 ^b	3,14 \pm 2,34 ^b	0,004
G1	12,86 \pm 5,61	4,71 \pm 4,54	9,14 \pm 4,60	0,066
G2	15,86 \pm 8,59	11,71 \pm 8,36	12,71 \pm 6,34	0,772
G3	13,00 \pm 12,49	10,71 \pm 10,08	11,86 \pm 6,87	0,867
G4	14,71 \pm 13,35	5,71 \pm 6,60	12,71 \pm 6,10	0,368
G5	9,43 \pm 9,11	3,86 \pm 3,02	4,14 \pm 3,98	0,651
G6	15,71 \pm 17,19	5,86 \pm 5,55	12,43 \pm 5,86	0,236

Letras minúsculas diferentes na mesma linha significam diferença estatística

M1: antes da suplementação oral com vitamina C e E

M2: após 30 dias de suplementação por via oral com vitamina C e

M3 com 60 dias de suplementação por via oral com vitamina C e E

Houve diferença significativa entre os momentos analisados no subgrupo Controle, onde M1 foi superior a M2 e M3.

Resultados do experimento II

Tabela 29: Média \pm desvio padrão dos resultados de motilidade progressiva (**MP - %**) pós descongelação do grupo Subfértil em cada subgrupo (**Controle**, **G1**: Adição de SOD, **G2**: Adição de Catalase, **G3**: Adição de Vitamina C, **G4**: Adição de Vitamina E, **G5**: Adição da associação de SOD e Catalase, **G6**: Adição da associação de Vitamina C e E) nos três momentos analisados: M1, M2 e M3. Botucatu, 2010.

	Momento 1	Momento 2	Momento 3	p
Controle	11,17 \pm 7,68	12,33 \pm 13,28	12,67 \pm 12,89	0,738
G1	13,17 \pm 7,14	13,83 \pm 12,51	15,67 \pm 11,50	0,311
G2	14,83 \pm 12,27	14,83 \pm 12,89	20,00 \pm 15,72	0,321
G3	3,83 \pm 2,32	14,50 \pm 10,82	23,50 \pm 17,95	0,183
G4	5,17 \pm 5,12	16,50 \pm 17,46	17,50 \pm 13,50	0,568
G5	7,50 \pm 7,48	4,33 \pm 4,89	4,83 \pm 2,64	0,156
G6	3,50 \pm 5,75 ^a	11,83 \pm 13,91 ^b	18,50 \pm 13,95 ^c	0,032

Letras minúsculas diferentes na mesma linha significam diferença estatística

M1: antes da suplementação oral com vitamina C e E

M2: após 30 dias de suplementação por via oral com vitamina C e

M3 com 60 dias de suplementação por via oral com vitamina C e E

Não houve diferença significativa entre os momentos em nenhum subgrupo.

Tabela 30: Média \pm desvio padrão dos resultados da análise da velocidade do trajeto (**VAP - $\mu\text{m/s}$**) pós descongelação do grupo Fértil em cada subgrupo **Controle**, **G1**: Adição de SOD, **G2**: Adição de Catalase, **G3**: Adição de Vitamina C, **G4**: Adição de Vitamina E, **G5**: Adição da associação de SOD e Catalase, **G6**: Adição da associação de Vitamina C e E nos três momentos analisados: M1, M2 e M3. Botucatu, 2010.

	Momento 1	Momento 2	Momento 3	p
Controle	67,83 \pm 10,29	52,81 \pm 25,36	58,26 \pm 13,86	0,513
G1	76,80 \pm 7,99	59,17 \pm 27,83	70,44 \pm 5,64	0,135
G2	77,97 \pm 4,13 ^a	69,00 \pm 30,75 ^b	69,94 \pm 8,98 ^b	0,030
G3	75,66 \pm 16,53	68,71 \pm 31,87	71,29 \pm 13,07	0,607
G4	79,93 \pm 14,65	59,40 \pm 27,90	80,53 \pm 8,93	0,311
G5	75,99 \pm 12,14	57,26 \pm 26,42	64,93 \pm 22,85	0,607
G6	80,04 \pm 10,96	56,92 \pm 26,21	69,80 \pm 7,56	0,513

Letras minúsculas diferentes na mesma linha significam diferença estatística

M1: antes da suplementação oral com vitamina C e E

M2: após 30 dias de suplementação por via oral com vitamina C e

M3 com 60 dias de suplementação por via oral com vitamina C e E

Houve diferença entre os momentos apenas no subgrupo G2, onde M1 foi superior a M2 e M3.

Resultados do experimento II

Tabela 31: Média \pm desvio padrão dos resultados da análise da velocidade do trajeto (**VAP** - $\mu\text{m/s}$) pós descongelação do grupo Subfértil em cada subgrupo (**Controle**, **G1**: Adição de SOD, **G2**: Adição de Catalase, **G3**: Adição de Vitamina C, **G4**: Adição de Vitamina E, **G5**: Adição da associação de SOD e Catalase, **G6**: Adição da associação de Vitamina C e E) nos três momentos analisados: M1, M2 e M3. Botucatu, 2010.

Momento Subgrupo	M1	M2	M3	p
Controle	70,00 \pm 8,89	61,13 \pm 31,32	72,17 \pm 17,60	0,311
G1	72,68 \pm 12,45	62,35 \pm 33,24	77,22 \pm 6,98	0,135
G2	71,47 \pm 7,09	62,23 \pm 31,20	81,13 \pm 8,47	0,052
G3	65,25 \pm 5,99 ^a	80,15 \pm 8,25 ^b	86,25 \pm 10,70 ^b	0,009
G4	63,23 \pm 6,15	64,38 \pm 32,27	70,48 \pm 11,51	0,223
G5	78,48 \pm 19,69	55,30 \pm 31,17	62,40 \pm 14,09	0,311
G6	61,30 \pm 18,05	55,75 \pm 30,31	78,65 \pm 3,97	0,115

Letras minúsculas diferentes na mesma linha significam diferença estatística

M1: antes da suplementação oral com vitamina C e E

M2: após 30 dias de suplementação por via oral com vitamina C e

M3 com 60 dias de suplementação por via oral com vitamina C e E

Houve diferença entre os momentos apenas no subgrupo G3, onde M1 foi superior a M2 e M3.

Tabela 32: Média \pm desvio padrão dos resultados de velocidade progressiva (**VSL** - $\mu\text{m/s}$) pós descongelação do grupo Fértil em cada subgrupo **Controle**, **G1**: Adição de SOD, **G2**: Adição de Catalase, **G3**: Adição de Vitamina C, **G4**: Adição de Vitamina E, **G5**: Adição da associação de SOD e Catalase, **G6**: Adição da associação de Vitamina C e E nos três momentos analisados: M1, M2 e M3. Botucatu, 2010.

	M1	M2	M3	
Controle	60,10 \pm 8,70	54,03 \pm 28,01	65,12 \pm 18,04	0,050
G1	63,40 \pm 11,40	54,57 \pm 28,66	66,87 \pm 6,64	0,180
G2	62,67 \pm 8,97	55,32 \pm 28,13	70,82 \pm 8,42	0,276
G3	59,17 \pm 5,75	71,53 \pm 8,74	78,33 \pm 9,93	0,368
G4	53,35 \pm 12,02	56,75 \pm 29,18	64,25 \pm 9,74	0,156
G5	68,30 \pm 15,51	50,08 \pm 30,16	56,28 \pm 11,90	0,651
G6	55,05 \pm 18,73	50,80 \pm 27,97	70,47 \pm 3,68	0,276

Letras minúsculas diferentes na mesma linha significam diferença estatística

M1: antes da suplementação oral com vitamina C e E

M2: após 30 dias de suplementação por via oral com vitamina C e

M3 com 60 dias de suplementação por via oral com vitamina C e E

Não houve diferença entre os momentos.

Resultados do experimento II

Tabela 33: Média \pm desvio padrão dos resultados de velocidade progressiva (VSL - $\mu\text{m/s}$) pós descongelação do grupo Subfértil em cada subgrupo: **Controle**, **G1**: Adição de SOD, **G2**: Adição de Catalase, **G3**: Adição de Vitamina C, **G4**: Adição de Vitamina E, **G5**: Adição da associação de SOD e Catalase, **G6**: Adição da associação de Vitamina C e E nos três momentos analisados: M1, M2 e M3. Botucatu, 2010.

Momento Subgrupo	M1	M2	M3	p
Controle	59,76 \pm 8,13	45,24 \pm 22,10	48,90 \pm 10,73	0,115
G1	68,56 \pm 7,16	50,71 \pm 24,51	59,40 \pm 3,85	0,846
G2	68,03 \pm 3,71	59,20 \pm 26,40	61,96 \pm 8,38	0,280
G3	70,53 \pm 13,76 ^a	60,89 \pm 28,41 ^b	63,71 \pm 10,59 ^b	0,009
G4	72,06 \pm 12,20	51,37 \pm 24,72	72,14 \pm 9,36	0,311
G5	67,00 \pm 13,18	50,49 \pm 24,24	55,34 \pm 18,91	0,311
G6	70,37 \pm 9,50	50,31 \pm 23,69	61,89 \pm 5,53	0,115

Letras minúsculas diferentes na mesma linha significam diferença estatística

M1: antes da suplementação oral com vitamina C e E

M2: após 30 dias de suplementação por via oral com vitamina C e

M3 com 60 dias de suplementação por via oral com vitamina C e E

No subgrupo G3, houve diferença entre os momentos, onde M1 foi superior a M2 e a M3.

Tabela 34: Média \pm desvio padrão dos resultados de velocidade curvilínea (VCL - $\mu\text{m/s}$) pós descongelação do grupo Fértil em cada subgrupo: **Controle**, **G1**: Adição de SOD, **G2**: Adição de Catalase, **G3**: Adição de Vitamina C, **G4**: Adição de Vitamina E, **G5**: Adição da associação de SOD e Catalase, **G6**: Adição da associação de Vitamina C e E nos três momentos analisados: M1, M2 e M3. Botucatu, 2010.

Momento Subgrupo	M1	M2	M3	p
Controle	102,50 \pm 16,50	85,23 \pm 40,76	98,66 \pm 25,22	0,565
G1	104,59 \pm 12,51	96,27 \pm 44,72	108,47 \pm 11,63	0,867
G2	117,64 \pm 7,60	104,47 \pm 47,02	103,43 \pm 16,06	0,156
G3	116,61 \pm 27,84	102,83 \pm 47,74	107,70 \pm 21,13	0,867
G4	117,04 \pm 28,31	93,342 \pm 45,34	119,27 \pm 17,91	0,368
G5	112,06 \pm 19,98	89,30 \pm 40,81	107,69 \pm 27,05	0,368
G6	117,83 \pm 15,66	87,74 \pm 39,85	108,29 \pm 16,05	0,050

M1: antes da suplementação oral com vitamina C e E

M2: após 30 dias de suplementação por via oral com vitamina C e

M3 com 60 dias de suplementação por via oral com vitamina C e E

Não houve diferença significativa entre os momentos.

Resultados do experimento II

Tabela 35: Média \pm desvio padrão dos resultados de velocidade curvilínea (VCL - $\mu\text{m/s}$) pós descongelação do grupo Subfértil em cada subgrupo: **Controle**, **G1**: Adição de SOD, **G2**: Adição de Catalase, **G3**: Adição de Vitamina C, **G4**: Adição de Vitamina E, **G5**: Adição da associação de SOD e Catalase, **G6**: Adição da associação de Vitamina C e E nos três momentos analisados: M1, M2 e M3. Botucatu 2010

Momento Subgrupo	M1	M2	M3	p
Controle	105,87 \pm 10,86	93,55 \pm 47,22	104,90 \pm 10,11	0,846
G1	105,75 \pm 19,16	87,15 \pm 46,66	91,58 \pm 38,59	0,513
G2	103,82 \pm 12,31	89,57 \pm 44,31	115,72 \pm 11,98	0,135
G3	98,32 \pm 13,42	124,73 \pm 19,10	116,62 \pm 19,41	0,520
G4	97,70 \pm 11,14	98,48 \pm 50,46	97,77 \pm 20,35	0,223
G5	126,77 \pm 28,73	84,37 \pm 41,97	95,55 \pm 23,52	0,311
G6	92,93 \pm 15,84	79,25 \pm 42,49	116,40 \pm 8,92	0,135

M1: antes da suplementação oral com vitamina C e E

M2: após 30 dias de suplementação por via oral com vitamina C e

M3 com 60 dias de suplementação por via oral com vitamina C e E

Não houve diferença significativa entre os momentos.

Tabela 36: Média \pm desvio padrão dos resultados de Espermatozóides com movimento rápido (RAP, %), pós descongelação do grupo Fértil em cada subgrupo: **Controle**, **G1**: Adição de SOD, **G2**: Adição de Catalase, **G3**: Adição de Vitamina C, **G4**: Adição de Vitamina E, **G5**: Adição da associação de SOD e Catalase, **G6**: Adição da associação de Vitamina C e E nos três momentos analisados: M1, M2 e M3. Botucatu, 2010.

Momento Subgrupo	M1	M2	M3	p
Controle	11,43 \pm 7,76 ^a	3,43 \pm 2,94 ^b	3,57 \pm 2,76 ^b	0,028
G1	13,43 \pm 5,80	5,29 \pm 4,79	11,14 \pm 5,93	0,062
G2	17,14 \pm 9,32	13,29 \pm 9,52	13,71 \pm 6,52	0,867
G3	14,00 \pm 13,11	10,43 \pm 11,41	12,43 \pm 6,80	0,565
G4	16,00 \pm 15,03	6,29 \pm 6,73	12,86 \pm 8,76	0,459
G5	9,86 \pm 9,74	4,29 \pm 3,86	5,00 \pm 5,10	0,651
G6	17,57 \pm 20,56	6,00 \pm 5,74	13,29 \pm 6,16	0,156

Letras minúsculas diferentes na mesma linha significam diferença estatística

M1: antes da suplementação oral com vitamina C e E

M2: após 30 dias de suplementação por via oral com vitamina C e

M3 com 60 dias de suplementação por via oral com vitamina C e E

Houve diferença significativa no subgrupo Controle, onde M1 foi superior a M2 e M3.

Resultados do experimento II

Tabela 37: Média \pm desvio padrão dos resultados de Espermatozoides com movimento rápido (RAP, %), pós descongelção do grupo Subfertil em cada subgrupo: **Controle**, **G1**: Adição de SOD, **G2**: Adição de Catalase, **G3**: Adição de Vitamina C, **G4**: Adição de Vitamina E, **G5**: Adição da associação de SOD e Catalase, **G6**: Adição da associação de Vitamina C e E nos três momentos analisados: M1, M2 e M3. Botucatu, 2010.

Momento Subgrupo	M1	M2	M3	p
Controle	8,83 \pm 5,78	14,00 \pm 15,03	13,67 \pm 14,14	0,873
G1	14,00 \pm 7,40	15,33 \pm 13,94	17,50 \pm 13,19	0,311
G2	6,17 \pm 3,66	16,50 \pm 14,25	22,17 \pm 17,68	0,260
G3	4,17 \pm 2,93	17,33 \pm 14,84	25,00 \pm 18,55	0,135
G4	5,33 \pm 4,97	17,67 \pm 18,15	15,67 \pm 13,57	0,568
G5	5,83 \pm 7,39	5,00 \pm 5,29	4,83 \pm 2,64	0,861
G6	3,67 \pm 6,15 ^b	12,33 \pm 14,62 ^b	20,00 \pm 14,63 ^a	0,032

Letras minúsculas diferentes na mesma linha significam diferença estatística

M1: antes da suplementação oral com vitamina C e E

M2: após 30 dias de suplementação por via oral com vitamina C e

M3 com 60 dias de suplementação por via oral com vitamina C e E

Houve diferença significativa em G6, onde M3 foi superior a M1 e M2.

Tabela 38: Média \pm desvio padrão dos resultados de espermatozoides com integridade de membrana acrossomal e plasmática (%), pós descongelção do grupo Fertil em cada subgrupo: **Controle**, **G1**: Adição de SOD, **G2**: Adição de Catalase, **G3**: Adição de Vitamina C, **G4**: Adição de Vitamina E, **G5**: Adição da associação de SOD e Catalase, **G6**: Adição da associação de Vitamina C e E nos três momentos analisados: M1, M2 e M3. Botucatu, 2010.

Momento Subgrupo	M1	M2	M3	p
Controle	20,00 \pm 5,80	13,71 \pm 2,69	26,43 \pm 9,74	0,120
G1	21,43 \pm 3,95	17,71 \pm 7,67	25,71 \pm 5,77	0,050
G2	27,29 \pm 8,96	19,71 \pm 11,38	22,43 \pm 5,83	0,565
G3	18,71 \pm 7,02	17,43 \pm 10,53	25,86 \pm 6,31	0,368
G4	20,29 \pm 7,34	18,57 \pm 8,30	24,86 \pm 8,99	0,618
G5	21,71 \pm 9,43	11,57 \pm 8,70	23,71 \pm 8,26	0,066
G6	21,57 \pm 12,18	12,71 \pm 5,96	28,57 \pm 10,06	0,156

M1: antes da suplementação oral com vitamina C e E

M2: após 30 dias de suplementação por via oral com vitamina C e

M3 com 60 dias de suplementação por via oral com vitamina C e E

Não houve diferença significativa entre os momentos.

Resultados do experimento II

Tabela 39: Média \pm desvio padrão dos resultados de espermatozoides com integridade de membrana acrossomal e plasmática (%), pós descongelação do grupo Subfértil em cada subgrupo: **Controle**, **G1**: Adição de SOD, **G2**: Adição de Catalase, **G3**: Adição de Vitamina C, **G4**: Adição de Vitamina E, **G5**: Adição da associação de SOD e Catalase, **G6**: Adição da associação de Vitamina C e E nos três momentos analisados: M1, M2 e M3. Botucatu 2010

Momento Subgrupo	M1	M2	M3	p
Controle	25,33 \pm 9,33	19,00 \pm 7,16	27,83 \pm 8,18	0,311
G1	23,50 \pm 10,91	18,83 \pm 9,52	27,50 \pm 7,99	0,438
G2	26,17 \pm 11,23	14,33 \pm 8,57	24,33 \pm 8,71	0,607
G3	25,50 \pm 16,29	19,50 \pm 6,57	24,67 \pm 9,65	0,607
G4	22,50 \pm 7,92	21,17 \pm 12,02	25,67 \pm 9,63	0,568
G5	23,50 \pm 8,96	19,00 \pm 7,04	32,67 \pm 8,26	0,069
G6	17,00 \pm 8,41	15,50 \pm 3,02	26,17 \pm 10,23	0,311

M1: antes da suplementação oral com vitamina C e E

M2: após 30 dias de suplementação por via oral com vitamina C e

M3 com 60 dias de suplementação por via oral com vitamina C e E

Não houve diferença significativa entre os momentos em nenhum subgrupo.

Tabela 40: Média \pm desvio padrão dos resultados da análise da **morfologia espermática** pré congelação nos três momentos analisados: M1, M2 e M3. Botucatu, 2010.

Momento Grupo	M1	M2	M3	p
Fértil	82,86 \pm 9,21 ^A	85,14 \pm 5,90 ^A	87,57 \pm 5,03 ^A	0,276
Subfértil	44,50 \pm 18,35 ^{Ba}	59,50 \pm 8,76 ^{Ba}	81,83 \pm 5,42 ^{Ab}	0,006
P	0,005	0,001	0,138	

Letras minúsculas diferentes na mesma linha significam diferença estatística

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna significam diferença estatística

M1: antes da suplementação oral com vitamina C e E

M2: após 30 dias de suplementação por via oral com vitamina C e

M3 com 60 dias de suplementação por via oral com vitamina C e E

Para a morfologia espermática, no grupo Fértil, não houve diferença significativa entre os momentos. No grupo Subfértil, entretanto, houve diferença entre os momentos, sendo M3 superior a M1 e M2.

Entre os grupos, foi verificado diferença significativa em M1 e M2, com superioridade do grupo fértil. Em M3, não houve diferença entre os grupos.

Resultados do experimento II

➤ Avaliação de estresse oxidativo

Taxa de peroxidação lipídica

Tabela 41: Média \pm desvio padrão obtidos da concentração substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (MDA – ng/mL) no plasma seminal dos animais pertencentes aos grupos (Fértil e Subfértil) nos três momentos analisados: M1, M2 e M3. Botucatu, 2010.

Momento Grupo	M1	M2	M3	p
Fértil	735,20 \pm 153,80 ^A	554,70 \pm 154,50	531,60 \pm 158,90	0,162
Subfértil	507,96 \pm 161,13 ^B	499,11 \pm 142,47	461,97 \pm 136,51	0,683
P	0,041	0,516	0,419	

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna significam diferença estatística

M1: antes da suplementação oral com vitamina C e E

M2: após 30 dias de suplementação por via oral com vitamina C e

M3 com 60 dias de suplementação por via oral com vitamina C e E

Entre os grupos, houve diferença em M1. O grupo Fértil foi superior ao Subfértil. Não houve diferença entre os momentos.

Antioxidantes

Catalase

Com o teste utilizado não foi possível detectar concentrações mínimas de Catalase no plasma seminal dos animais avaliados neste experimento.

Superóxido Dismutase

Tabela 42: Média \pm desvio padrão obtidos da concentração de Superóxido Dismutase (SOD – ng/mL) no plasma seminal dos animais pertencentes aos grupos (Fértil e Subfértil) nos três momentos analisados: M1, M2 e M3. Botucatu, 2010.

Momento Grupo	M1	M2	M3	p
Fértil	1303,93 \pm 595,33	1287,08 \pm 866,38	1060,95 \pm 623,45	1,000
Subfértil	1292,90 \pm 322,74	724,34 \pm 712,06	956,84 \pm 560,69	0,472
P	1,000	0,366	0,945	

M1: antes da suplementação oral com vitamina C e E

M2: após 30 dias de suplementação por via oral com vitamina C e

M3 com 60 dias de suplementação por via oral com vitamina C e E

Não se verificou diferença significativa entre os grupos ou entre os momentos, para a concentração de SOD.

Resultados do experimento II

Vitamina E

Tabela 43: Média \pm desvio padrão obtidos da concentração de vitamina E (micromol/L) no plasma seminal dos animais pertencentes aos grupos (Fértil e Subfértil) nos três momentos analisados: M1, M2 e M3. Botucatu, 2010.

Momento Grupo	M1	M2	M3	p
Fértil	12,63 \pm 6,43	17,57 \pm 1,90	13,23 \pm 2,30	0,180
Subfértil	11,85 \pm 5,81	13,03 \pm 5,85	11,92 \pm 2,94	0,607
P	0,836	0,073	0,234	

Letras minúsculas diferentes na mesma linha significam diferença estatística

M1: antes da suplementação oral com vitamina C e E

M2: após 30 dias de suplementação por via oral com vitamina C e

M3 com 60 dias de suplementação por via oral com vitamina C e E

Para a concentração de vitamina E no plasma seminal, verificou-se diferença no grupo Fértil, onde M2 foi superior a M1 e M3.

Vitamina C

Tabela 44: Média \pm desvio padrão obtidos da concentração de vitamina C (micromol/mL) no plasma seminal dos animais pertencentes aos grupos (Fértil e Subfértil) nos três momentos analisados: M1, M2 e M3. Botucatu, 2010.

Momento Grupo	M1	M2	M3	p
Fértil	106,40 \pm 25,97	133,10 \pm 45,16	112,04 \pm 16,52	0,607
Subfértil	133,58 \pm 58,78	192,93 \pm 210,03	105,09 \pm 34,56	0,311
P	0,589	0,836	0,534	

M1: antes da suplementação oral com vitamina C e E

M2: após 30 dias de suplementação por via oral com vitamina C e

M3 com 60 dias de suplementação por via oral com vitamina C e E

Não se verificou diferença significativa entre os grupos ou entre os momentos, para a concentração de vitamina C no plasma seminal.

9. Discussão Experimento II

Neste experimento avaliou-se a suplementação com antioxidantes, por via oral e no meio diluente sobre o procedimento da congelação de sêmen de cães férteis e subférteis e análise do estresse oxidativo e antioxidante no plasma seminal.

Após cerca de 60 dias do início da suplementação oral (M3) pode-se verificar a associação da suplementação e a adição de antioxidantes ao meio diluente de congelação. O meio diluente com a associação de SOD e catalase promoveu os piores resultados pós descongelação tanto no grupo fértil quanto no grupo subfértil. Estes animais estavam recebendo uma suplementação oral de vitamina C e E há 60 dias. A associação de todos estes antioxidantes agindo de diferentes formas e contra diferentes ROS, talvez tenha diminuído as concentrações de ROS o suficiente para que elas tenham atingido uma concentração mínima insuficiente. Para que o espermatozóide tenha motilidade uma concentração basal de ROS deve existir (DE LAMIRANDE e GAGNON, 1994, AITKEN et al., 1995, DE LAMIRANDE et al., 1997). Pequenas quantidades de ROS são produzidas continuamente no espermatozóide e desempenham um papel importante na capacitação, hiperativação, motilidade, reação de acrossoma e desta maneira da fertilização. (AITKEN et al. 1989, AGARWAL et al., 2006). Analisando o resultado da associação de SOD e catalase no meio diluente (G5), em M1 e M2 não foi verificada diferença em relação ao controle, ou seja, a piora da cinética espermática pós descongelação em G5 deve ter sido causada por um excesso de antioxidantes.

A vitamina C pode se tornar uma substância oxidante, quando em excesso, ou quando na presença de ferro (AITKEN et al., 1993; HALLIWELL e GUTTRIDGE, 1999). Quando se associou a suplementação oral de vitamina C, com a adição de vitamina C no meio diluente o qual continha gema de ovo e, portanto, uma fonte expressiva de ferro, nenhum efeito deletério foi observado. Ao contrário, o subgrupo G3, em M3, obteve os maiores valores para

Discussão do experimento II

motilidade total, VSL e RAP no grupo fértil e motilidade progressiva, VAP, VSL, VCL e RAP no grupo subfértil.

Durante o processo de congelação/descongelação espermática há produção de ROS (WATSON, 2000). Segundo Lahnsteiner et al. (2010) o armazenamento *in vitro* de espermatozóide de truta, aumentou a concentração de peróxidos tanto no plasma seminal quanto nos espermatozóides, indicando geração de ROS. Uma das razões para a geração de ROS é a presença de crioprotetor no meio diluente. Os crioprotetores apresentam uma osmolaridade muito alta e a exposição dos espermatozóides a uma solução hiperosmótica aumenta a produção de ânion superóxido (BURNAUGH et al., 2010). Estes fatores podem levar a um aumento da peroxidação lipídica e, portanto, do estresse oxidativo.

Em sêmen de humanos observou-se que a adição de SOD (100U/mL) e catalase (100U/mL) no meio diluente de congelação (TRIS/gema de ovo) aumentou a motilidade espermática e a funcionalidade da membrana espermática na descongelação. Quando se utilizou apenas uma dessas enzimas antioxidantes, nenhuma diferença significativa foi observada (ROSSI et al., 2001). Os autores atribuíram seus resultados a ação conjunta da SOD e da catalase contra o ânion superóxido e peróxido de hidrogênio. Em sêmen de suínos a associação de SOD e da catalase também foi benéfica aumentando a sobrevivência do sêmen descongelado (PURSEL et al., 1978).

A adição de catalase (G2) no meio diluente no M3, promoveu um aumento da motilidade total, motilidade progressiva e RAP nos animais do grupo fértil. Talvez isto tenha ocorrido pela diminuição do peróxido de hidrogênio, uma vez que na oxidação do ácido ascórbico para ácido dihidroascórbico é gerado peróxido de hidrogênio (LANZAFAME et al., 2009). Talvez também por este motivo nenhum efeito tenha sido encontrado com a adição de SOD (G1) no meio diluente.

A adição de catalase (G2) no meio diluente promoveu um aumento da motilidade progressiva, VAP e RAP dos animais subférteis. Neste grupo, a remoção do peróxido de hidrogênio auxiliou também na melhora da velocidade

Discussão do experimento II

do espermatozóide, indicando que a catalase exerce efeito distinto nos animais subférteis, talvez pelos espermatozóides desses animais apresentarem uma sensibilidade diferente ao peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio é uma molécula que se difunde pelas membranas espermáticas (SILVA et al., 2006). Assim, qualquer diferença na composição da membrana espermática pode gerar uma sensibilidade diferente a esta ROS.

A adição de vitamina E (G4) no meio diluente apresentou, no grupo fértil, melhores resultados na manutenção de motilidade progressiva, VAP e RAP e resultados inferiores de VSL. Nenhuma diferença foi obtida com este meio no grupo subfértil, demonstrando mais uma vez uma diferença de sensibilidade dos espermatozóide aos ROS, entre os grupos.

Um fator que pode ter sido determinante para os baixos resultados obtidos na análise da cinética espermática, pelo sistema CASA, é a baixa concentração espermática das amostras conforme discutido no experimento I. Rijsselaere et al., (2003) testaram a avaliação pelo CASA utilizando três diferentes concentrações espermáticas (25 , 50 e 100×10^6 sptz/mL) e observaram que quanto maior a concentração da amostra, melhores eram os resultados obtidos em VAP, VSL, VCL e RAP. No presente estudo, não foi possível utilizar maiores concentrações por palheta, uma vez que os animais do grupo subfértil necessariamente teriam que apresentar baixa concentração espermática, pré requisito para ser incluído no experimento. Assim, como o objetivo era padronizar e evitar que a diferença de concentração impedisse uma comparação efetiva entre grupos, optou-se por manter em 15×10^6 sptz/palheta em todas as amostras.

Em relação a variável integridade de membrana acrossomal e plasmática não foi evidenciada diferença significativa entre os grupos ou entre os momentos, ou seja, não houve influência da suplementação oral, nem da adição de antioxidante ao meio diluente sobre essa característica seminal. Corroborando com os resultados deste experimento, Baptista Sobrinho (2009) não observou diferença significativa na integridade das membranas plasmática

Discussão do experimento II

e acrossomal, com a adição de vitamina E ou glutathiona no meio de congelação de cães.

Em bovinos, ao contrário, a adição de 4,5 mg/mL de vitamina C no meio de congelação reduziu a produção de ROS e melhorou a conservação da membrana plasmática e acrossomal (HU et al., 2010). Rodello (2010) adicionou catalase ao meio diluente de congelação de espermatozóides de carneiros e verificou uma melhora na integridade de membrana acrossomal e plasmática. O mesmo foi observado por Maxwell e Stojanov (1996) em carneiros.

Avaliando o efeito da suplementação (diferença entre momentos), observou-se diferença significativa apenas nos subgrupos controle e G2 no grupo fértil e G3 e G6 no subfértil e houve diferença no padrão da resposta entre os grupos.

Em relação aos momentos avaliados a suplementação oral foi prejudicial no grupo fértil, ou seja, a suplementação não aumentou a cinética espermática como se esperava, no intervalo entre M1 a M3. A suplementação oral influenciou negativamente os resultados quando foi utilizado o meio diluente controle (MT, MP, RAP) ou com a adição de catalase (VAP) (G2). Aparentemente o peróxido de hidrogênio se faz necessário para a manutenção da velocidade quando há uma suplementação oral com vitaminas C e E.

Adicionando-se vitamina C (1g/L) e E (200mg/kg) e sua associação (200mg/kg de vitamina E e 1g/L de vitamina C) na água de coelhos por 2 meses, observou-se que a adição de vitamina E e a associação das vitaminas aumentou a motilidade espermática (CASTELLINI et al., 2000).

A suplementação oral apresentou efeito benéfico na conservação da motilidade espermática progressiva e percentual de espermatozóides rápidos pós descongelação dos animais subférteis, quando se utilizou meio com adição de vitamina C e E. A vitamina C e a vitamina E devem funcionar sinergicamente *in vivo* para reduzir o dano peroxidativo no espermatozóide, através da junção de suas propriedades lipofílicas e hidrofílicas. Quando estão associadas elas agem diretamente no espermatozóide para impedir danos

Discussão do experimento II

causados pelas ROS, esta melhora pode ser rápida, tanto no espermatozóide que já foi ejaculado (suplementação do meio diluente) quanto no que ainda estão no epidídimo (suplementação oral) (LANZAFAME et al., 2009).

Quando se utilizou meio com adição apenas da vitamina C, observou-se que a velocidade do trajeto (VAP) aumentou com a suplementação oral enquanto que a velocidade progressiva diminuiu (VSL). Ou seja, apesar da velocidade média ter aumentado, a trajetória destes espermatozóides não foi retilínea. Desta forma parece ser recomendável a associação das vitaminas C e E do que apenas a adição de vitamina C.

A suplementação por via oral com vitamina C e E diminuiu a porcentagem de espermatozóides com patologias dos animais subférteis. Esses efeitos começaram a ser percebidos após 30 dias do início da suplementação e aos 60 dias os resultados já foram semelhantes aos dos animais férteis. Corroborando com Hatamoto (2004) que observou uma redução das patologias espermáticas em cães estressados, mas que receberam suplementação oral com vitamina E (500mg/dia). Marin-Guzman e colaboradores (1997) alegaram que o decréscimo da patologia espermática que ocorre devido a suplementação oral seria provocado pela ligação das vitaminas com os endoperóxidos.

A capacidade de gerar ROS é maior nos espermatozóides com defeitos (IWASAKI e GAGNON, 1992), principalmente aqueles que possuem gota citoplasmática (GOMEZ et al, 1996). Estes espermatozóides possuem maior quantidade de enzimas citoplasmáticas, inclusive a glicose-6-fosfato-desidrogenase. Esta enzima é responsável pelo fluxo de glicose e está associada a geração de NADPH. Esta geração de NADPH funciona como uma grande fonte de elétrons, responsáveis pela produção de ânion superóxido pelo espermatozóide (BAUMBER et al., 2000).

Este fato pode ser verificado neste experimento com um dos animais pertencentes ao grupo subfértil. Ele apresentava, antes da suplementação oral, aproximadamente 67% de espermatozóides com patologia espermática, sendo 53% de gota citoplasmática (31% distais e 22% proximais) e 705,17 ng/mL de

Discussão do experimento II

MDA (índice de peroxidação lipídica). Após 60 dias de suplementação oral, este animal apresentou apenas 18% de espermatozóides com defeitos (4% de gota citoplasmática) e 500,54 ng/mL de MDA.

A suplementação de antioxidante por via oral não alterou o percentual de patologia espermática dos animais do grupo fértil. Estes animais também não sofreram alteração na concentração de TBARS do plasma seminal nos três momentos analisados. Acredita-se que no grupo fértil a porcentagem de células com defeitos totais (aproximadamente 15%) não se deva ao estresse oxidativo. Não foi levado em consideração nesse caso, o tipo de defeito apresentado por esses animais.

Hatamoto, (2004) observou uma diminuição do percentual de espermatozóides com defeitos em cães, quando os animais foram suplementados com vitamina E por 60 dias.

A suplementação a dieta de coelhos com vitamina C, E e sua associação, ocasionou uma diminuição da patologia espermática de animais sem problemas reprodutivos. Observou-se uma diminuição da formação de TBARS, indicando que a suplementação oral de antioxidante reduziu a peroxidação lipídica no plasma seminal desses coelhos (YOUSEF et al., 2003).

Administração de vitamina C (10 mg/kg de peso vivo) reduziu a concentração de MDA testicular e o percentual de espermatozóides com defeitos em ratos. A vitamina E (100 mg/kg peso vivo) apresentou efeito semelhante. A associação das duas vitaminas, nas mesmas dosagens, levaram a uma redução mais significativa da concentração de MDA e do percentual de espermatozóides patológicos (MISHRA e ACHARYA, 2004).

O plasma seminal é a principal fonte de defesa antioxidante para o espermatozóide. A avaliação de TBARS no plasma seminal reflete o índice de estresse oxidativo ao qual este espermatozóide está exposto, podendo ser usado como um indicativo da necessidade ou não de uma suplementação oral com antioxidantes. O grupo dos animais férteis mostrou uma concentração de TBARS superior ao do grupo subfértil, antes da suplementação, entretanto,

Discussão do experimento II

após a adição das vitaminas C e E na ração essa diferença não se manteve em M2 e M3.

Não houve diferença significativa, entre os grupos, na concentração de SOD no plasma seminal, em nenhum momento analisado. Corroborando com os resultados aqui apresentados, não foi observada nenhuma diferença significativa na atividade da SOD no plasma seminal de humanos sem e com problemas reprodutivos (HSIEH et al., 2002; KHOSROWBEYGI e ZARGHAMI, 2007). Ao contrário, Kawakami e colaboradores (2007) observaram menor atividade de SOD em cães com problemas reprodutivos (astenozoospermicos) do que nos considerados normais. Siciliano e colaboradores (2001) também observaram menor atividade de SOD em homens com problemas reprodutivos. Sanocka et al. (1997) observou maiores concentrações de SOD em homens com problemas reprodutivos (oligozoospermia, teratozoospermia, astenozoospermia) do que naqueles com ejaculado dentro do padrão fisiológico. O mesmo foi observado por Zini et al. (2000) em homens inférteis.

Discordando destes resultados, já foi relatado que humanos com ejaculado abaixo do padrão de motilidade, patologia e concentração espermática têm uma menor capacidade antioxidantes total no plasma seminal (antioxidantes não enzimáticos) do que os com normozoospermia (KHOSROWBEYGI e ZARGHAMI, 2007).

Não observou-se diferença entre os momentos e entre grupos, na concentração dos antioxidantes não enzimáticos (vitaminas C e E) no plasma seminal dos cães, indicando que a dosagem utilizada na suplementação oral não foi suficiente para atingir o plasma seminal. Mas deve ter colaborado para um maior equilíbrio oxidante/antioxidante do organismo como um todo. Desta maneira contribuindo para melhora de alguns parâmetros espermáticos.

Baseado no exposto percebe-se que a suplementação oral, no meio diluente ou a sua associação pode trazer benefícios para o processo de congelação/descongelação de sêmen cães. Principalmente para aqueles que possuem problemas reprodutivos, podendo inclusive, com a terapia oral reduzir ou eliminar esta característica.

10. Conclusão

- A adição de antioxidante no meio diluente não influenciou os resultados de descongelamento de sêmen de cães do grupo fértil. No grupo de cães subfértéis houve efeito positivo da SOD e da associação de SOD e catalase sobre as características de velocidade do sêmen.
- A taxa de peroxidação lipídica do grupo fértil foi superior ao do grupo subfértil. As concentrações de antioxidantes no plasma seminal, de cães férteis e subfértéis foram iguais.
- No grupo fértil a suplementação oral de 500mg de vitamina C e E durante 60 dias influenciou negativamente a motilidade total, progressiva, VAP e RAP pós descongelamento. No grupo subfértil a suplementação oral de 500mg de vitamina C e E durante 60 dias influenciou positivamente as características de motilidade progressiva e RAP, quando se associou vitamina C e E no meio diluente para congelamento.
- A suplementação oral de vitamina C e E influenciou positivamente a morfologia espermática dos cães do grupo subfértil.
- A taxa de peroxidação lipídica e as concentrações de antioxidantes no plasma seminal não sofreram influência da suplementação oral de vitamina C e E nos grupos fértil e subfértil.

11. Referência Bibliográfica:

AGARWAL, A. RAMADAN, A. MOHAMED, A.B. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and Sterility**.v. 79(4), p.829-843, 2003.

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

AGARWAL, A.; SALEH, R.A. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. **Urologic Clinics of North American** v. 29(4), p.817-27, 2002.

AITKEN R. J.; BUCKINGHAM, D.W., CARRERAS , A; IRVINE , S. Superoxide Dismutase In Human Sperm Suspensions: Relationship With Cellular Composition, Oxidative Stress, And Sperm Function. **Free Radical Biology & Medicine**, Vol. 21, No. 4, pp. 495-504, 1996

AITKEN RJ, PATERSON M, FISHER H, BUCKINGHAM DW, VAN DUIM M.Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. **Journal of Cell Science** v. 108, p. 2017–2025. 1995

AITKEN, R.J. Molecular mechanisms regulating human sperm function. **Molecular Human Reproduction** vol.3 no.3 pp. 169–173, 1997

AITKEN, R.J. The Amoroso Lecture. The human spermatozoon--a cell in crisis? **Journal of Reproduction and Fertility**. v.115(1), p.:1-7. Review, 1999.

AITKEN, R.J.; CLARKSON, J.S.; HARGREAVE, T.B. et al. Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia. **Journal of Andrology**. v. 10, p. 214–220,1989.

AITKEN, R.J.; GORDON, E.; HARKISS, D.; TWIGG, J.P.; MILNE, P.; JENNINGS, Z.; IRVINE, D.S. Relative Impact of Oxidative Stress on the Functional Competence and Genomic Integrity of Human Spermatozoa **Biology of Reproduction** v. 59, p. 1037–1046, 1998.

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

Referência Bibliográfica

AITKEN, R.J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. **Reproduction**. v. 122(4), p. 497-506, 2001.

AITKEN, R.J.; WEST, K.M.; BUCKINGHAM, D. Relationship between biochemical markers for residual sperm cytoplasm, reactive oxygen species generation, and the presence of leukocyte and precursor germ cell in human sperm cell suspension. **Molecular Reproduction and Development**, v. 39, p. 268-279, 1994.

ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. **Gamete Research**., v.23, p. 77–90, 1989.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. . Spermatozoal function. In: McKINNON, A.O., VOSS, J.L. **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, . 1137p, 1993

AMANN, R.P.; PICKET, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, p:145-173, 1987

AUDET, I.; LAFOREST, J.P.; MARTINEAU, G.P.; MATTE, J. J. Effect of vitamin supplements on some aspects of performance, vitamin status, and semen quality in boars. **Journal of Animal Science**. v.82, p.626-633, 2004.

AYDEMIR, B.; ONARAN, I.; KIZILER, A.R. et al. Increased oxidative damage of sperm and seminal plasma in men with idiopathic infertility is higher in patients with glutathione S-transferase Mu-1 null genotype. **Asian Journal of Andrology** v. 9, p. 108–115, 2007

BAKER, H.W.; BRINDLE, J.; IRVINE, D.S.; AITKEN, R.J. Protective effect of antioxidants on the impairment of sperm motility by activated polymorphonuclear leukocytes. **Fertility Sterility** v. 65 (2), p. 411–419, 1996.

BALERCIA, G.; ARMENI, T.; MANTERO, F.; PRINCIPATO, G.; REGOLI, F. Total oxyradical scavenging capacity toward different reactive oxygen species in seminal plasma and sperm cells. **Clinical Chemistry Laboratory Medicine** v. 41(1), p. 13-9, 2003.

BALL, B.A., MEDINA, V., GRAVANCE, C.G., BAUMBER, J. Effect of Antioxidants on Preservation of Motility, Viability and Acrosomal Integrity of Equine Spermatozoa During Storage at 5 °C. **Theriogenology** v. 56, p.577–589, 2001.

Referência Bibliográfica

BAPTISTA SOBRINHO, C.A. **Efeito do tratamento com antioxidantes na qualidade de espermatozóides criopreservados de cães**. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia , Universidade de São Paulo– São Paulo.

BAUMBER J, BALL BA, LINFOR JJ. Assessment of the Cryopreservation of Equine Spermatozoa in the Presence of Enzyme Scavengers and Antioxidants. **Am J Vet Res.** v.66(5)p. 772-9, 2005.

BAUMBER, J. BALL, B.A. LINFOR, J.J. MEYERS, S.A.. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. **Journal of Andrology.** v. 24, n. 4, p. 621-628.,2003

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; MEDINA,V.; DAVIES-MOREL, M.C. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. **Journal of Andrology**, v. 21, n.6, p.:895-902, 2000.

BECONI, M.T., Affranchino, M.A., Schang, L.M., Beorlegui, N.D. Influence of antioxidants on SOD activity in bovine sperm, **Biochem Int** v.23 , pp. 545–553, 1991.

BENDICH A. Antioxidant Micronutrients and Immune Responses. **Annals New York Academy of Sciences**, p. 168-180, 1990.

BESSEY, O. A. **Ascorbic acid. Microchemical methods.** In: Vitamin Methods. New York, Academic Press, v.1, p.303, 1960.

BILODEAU, J.P.; BLANCHETTE, S.; CORMIER, N.; SIRARD, M.A. Reactive Oxygen Species-Mediated Loss of Bovine Sperm Motility in Egg Yolk Tris Extender: Protection by Pyruvate, Metal Chelators and Bovine Liver or Oviductal Fluid Catalase **Theriogenology**, v. 57(3), p.1105-1122, 2002.

BLATT, D. H, Leonard, S. W., Traber, M.G. Vitamin E Kinetics and the Function of Tocopherol Regulatory Proteins. **Nutrition** v. 17, n. 10, 2001

BORGES, JC.; SILVA, MR.; RODRIGUES, L.; VANTINI, R.; ESPER,CR.; FRANCESCHINI, PH. Effect of antioxidant in the cryopreserved bovine semen evaluated by artificial insemination and in vitro fertilization. ICAR 2008 **Abstract** PO16

BRADFORD, A.; ATKINSON, J.; FULLER, N.; RAND, R. P. The effect of vitamin E on the structure of membrane lipid assemblies. **Journal of Lipid Research**, v. 44, p. 1940-1945, 2003.

Referência Bibliográfica

BREININGER, E., BEORLEGUI, N.B., O'FLAHERTY, C.M., BECONI, M.T. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. **Theriogenology** v.63, p. 2126–2135, 2005.

BUEGE, J.A.; AUST S. D. Microsomal Lipid peroxidation. **Methods Enzymology**, v.52, p. 302-310, 1978.

BUETTNER, G.R. The pecking order of free radicals and antioxidants, lipid peroxidation, alpha-tocopherol and ascorbate. **Arch Biochem Biophys.**, v. 300, p. 535–543, 1993.

BEUTLER, E. Red cell metabolism, 2nd ed., Greene & Straton . p. 89–90, 1975.

BURNAUGH, L.; BALL, B.A.; SABEUR, K.; THOMAS, A.D.; MEYERS, S.A. Osmotic stress stimulates generation of superoxide anion by spermatozoa in horses. **Animal Reproduction Science**. v. 117, (3), p. 249 – 260, 2010.

BURTON, G. W.; DOBA, T.; GABE, E. J.; HUGHES, L.; LEE, F. L.; PRASAD, L.; INGOLD, K. U. Autoxidation of Biological Molecules. 4. Maximizing the Antioxidant Activity of Phenols. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 107, p. 7053, 1985.

CALAMERA, J.C., FERNANDEZ, P.J., BUFFONE, M.G., ACOSTA, A.A., DONCEL, G.F. Effects of Long-Term in Vitro Incubation of Human Spermatozoa: Functional Parameters and Catalase Effect. **Andrologia** v.33, p.79–86, 2001.

CASTELLINI C, LATTAIOLI P, BERNARDINI M, DAL BOSCO A. Effect of dietary alpha-tocopheryl acetate and ascorbic acid on rabbit semen stored at 5°C. **Theriogenology** v.;54, p.523–33, 2000.

CBRA-Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte, 65p. (Elaborado conforme convênio CBRA/MA n. 017/1998), 1998.

CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; PIZZI, F.; GLIOZZI, T.M. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. **Reproduction** v.121, p.395-401, 2001.

CHEN, H.; CHEUNG, M.P.L.; CHOW, P.H.; O, W.S. Oxidative stress on the genomic integrity of epididymal and uterine sperm produced by male with all major accessory sex glands removed in the golden hamster. **Reproduction** v. 27, p. 87, 2001.

Referência Bibliográfica

CÓRDOBA, M.; MORA, N.; BECONI, M.T. Respiratory burst and NAD(P)H oxidase activity are involved in capacitation of cryopreserved bovine spermatozoa. **Theriogenology** v. 65, p. 882–892, 2006.

CUNHA, I. C. N.; LOPES, M. D. Efeitos da centrifugação sobre a qualidade do sêmen canino. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 23, n. 3, p.306-308, 1999.

DAWSON, E.B.; HARRIS, W.A.; RANKIN, W.E.; CHARPENTIER, L.A.; MCGANITY, W.J. Effect of ascorbic acid on male fertility. **Ann N Y Acad Sci.** p. 312-23, 1987.

de GRAAF, S.P.; EVANS, G.; GILLAN, L.; GUERRA, M. M. P.; MAXWELL, W. M.; O'BRIEN, J. K. The influence of antioxidant, cholesterol and seminal plasma on the in vitro quality of sorted and non-sorted ram spermatozoa. **Theriogenology.** v. 67, p. 217– 227, 2007.

de LAMIRANDE E, GAGNON C. Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa. **Free Radical Biol Med**; v.18, p. 487–495. 1995.

de LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing between beneficial and detrimental effects. **Hum. Reprod.** v.10, p. 15–21, 1992a.

de LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa: Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes; and II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. **J Androl.** v.13,p. 368–386, 1992b.

de MATOS , D. G.; FURNUS, C. C.; MOSES, D. F.; MARTINEZ, A. G.; MATKOVIC, M. Stimulation of glutathione synthesis of in vitro matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. **Molecular Reproduction and Development**, v. 45 (4), p.451 – 457, 1996.

DEICHSEL, K.; PALM, F.; KOBLISCHKE, P.; BUDIK, S.; AURICH, C. Effect of a dietary antioxidant supplementation on semen quality in pony stallions. **Theriogenology**, v. 69, p. 940–945, 2008.

DESAI, N.; SABANEKH, E.; KIM, E.H.; AGARWAI, A. Free Radical Theory of Aging: Implications in Male Infertility. **Urology** v.75, p. 14–19, 2010

DONNELLY, E.; McCLURE, N.; LEWIS, S.E.M. Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. **Fertil Steril.** v.72, p. 484–495, 1999.

Referência Bibliográfica

DRÖGE W. Aging-related changes in the thiol/disulfide redox state: implications for the use of thiol antioxidants. **Exp. Gerontol.**v. 37, n. 12, p.1333-1345, 2002.

EULENBERGER, K.; SCHÄFER – SOMI, S.; AURICH, C. Effect of Different Concentrations of Ascorbic Acid on Motility, Membrane Integrity and Chromatin Status of Frozen-Thawed Canine Spermatozoa Within Six Hours of Storage At 37°C. **Reproduction in Domestic Animals.** v. 44 Suppl 2, p.354-358, 2009.

EULENBERGER, K.; SCHÄFER – SOMI, S.; AURICH, C. Effect of Different Concentrations of Ascorbic Acid on Motility, Membrane Integrity and Chromatin Status of Frozen-Thawed Canine Spermatozoa Within Six Hours of Storage At 37°C. **Reproduction in Domestic Animals.** v. 44 Suppl 2, p.354-358, 2009.

FELDMAN, E.C., NELSON, R.W., **Canine and feline endocrinology and reproduction** .Philadelphia: W.B. Saunders, 487p, 2004.

GIL-GUZMAN, E.; OLLERO, M.; LOPEZ, M.C.; SHARMA, R.K.; ALVAREZ, J.G.; THOMAS, A.J.; AGARWAL, A. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. **Human Reproduction**, v. 16, p.1922–1930, 2001.

GLIOZZI, T.M., ZANIBONI, L., MALDJIAN, A., LUZI, F., MAERTENS, L., CEROLINI, S. Quality and lipid composition of spermatozoa in rabbits fed DHA and vitamin E rich diets **Theriogenology**, 2009.

GOMEZ E, BUCKINGHAM DW, BRINDLE J et al. Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. **Journal of Andrology.** v. 17, p. 276–287, 1996.

GRIVEAU, J. F. e LE LANNOU, D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. **International Journal of Andrology**, v. 20, p.61–69, 1997

GRIVEAU, J.F.; RENARD, P.; LE LANNOU, I.. An in vitro promoting role of human sperm capacitation for hydrogen peroxide. **Internation Journal of Andrology**; v. 17, p. 300–307, 1994

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 3rd edition. Oxford University Press, Oxford, 936p., 1999.

Referência Bibliográfica

HAMMERSTED, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v. 11, n. 1, p. 73-88, 1990.

HATAMOTO, L.K., SOBRINHO, B.C.A., NICHI, M., BARNABE, V.H., BARNABE, R.C., CORTADA, C.N.M. Effects of Dexamethasone Treatment (to Mimic Stress) and Vitamin E oral Supplementation on the Spermogram and on Seminal Plasma Spontaneous Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzyme Activities in Dogs. **Theriogenology** v.66, p.1610–1644, 2006.

HONG, Z.; HAILING, L.; HUI, M.; GUIJIE, Z.; LEYAN, Y.; DUBING, Y. Effect of Vitamin E Supplement in Diet on Antioxidant Ability of Testis in Boer Goat. **Animal Reproduction Science**. v. 117, p. 90-94, 2010.

HSIEH, Y. Y.; CHANG, C. C.; LIN, C. S. Seminal malondialdehyde concentration but not glutathione peroxidase activity is negatively correlated with seminal concentration and motility. **International Journal of Biological Sciences**. v. 2, p. 23–29, 2006.

HU, J. H.; ZAN, L.S.; ZHAO, X.S.; LI, Q.W. JIANG, Z.L.; LI, Y.K.; LI, X. Effects of trehalose supplementation on semen quality and oxidative stress variables in frozen-thawed bovine semen. *Journal of Animal Science*. v. 88, p. 1657-1662, 2010.

IBRAHIM, S.F.; OSMAN, K.; DAS, K.; OTHMAN, A.M.; MAJID, N.A.; RAHMAN, M.P.A. A study of the antioxidant effect of alpha - lipoic-acids on sperm quality. **Clinics**;v.64:p.545-50, 2008

ISLABÃO, N. Vitaminas: Seu metabolismo no homem e nos animais domésticos. Nobel, p. 202, 1990.

IWASAKI A, GAGNON, C. Formation of reactive species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil. Steril.* 58, p: 809-816, 1992.

JEONG, Y.J.; KIM, M.K.; SONG, H.J.; KANG, E.J.; OCK, S.A.; KUMAR, B. M.; BALASUBRAMANIAN, S.; RHO, G.J. Effect of α -tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. **Cryobiology**, v. 58, p. 181–189, 2009.

JEULIN, C.; SOUFIR, J.C.; MARSON, J. et al. Acetylcarnitine and spermatozoa: relationship with epididymal maturation and motility in the boar and man. **Reproduction, Nutrition and Development** v. 28, p.1317–1327, 1988.

Referência Bibliográfica

KAWAKAMI, E.; TAKEMURA, A.; SAKUMA, M.; TAKANO, M.; HIRANO, T.; HORI, T.; TSUTSUI, T. Superoxide Dismutase and Catalase Activities in the Seminal Plasma of Normozoospermic and Asthenozoospermic Beagles. **Journal of Veterinary Medicine Science**. v.69 (2), p. 133 – 136, 2007.

KHOSROWBEYGI, A.; ZARGHAMI, N. Levels of oxidative stress biomarkers in seminal plasma and their relationship with seminal parameters. *BMC Clinical Pathology*. v. 7, p.6. 2007

KIM, J.G.; PARTHASARATHY, S. Oxidation and the spermatozoa. **Semin Reprod Endocrinol.**, v.16(4), p.:235-239, 1998.

KOBAYASHI, T.; MIYAZAKI, T.; NATORI, M.; NOZAWA, S. Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa. **Human Reproduction** v. 6, p. 987–991, 1991.

KOPPERS, A.J.; de IULIIS, G.N.; FINNIE, J.M. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 93, p.3199-3207, 2008

KRUGER, T.F.; ACOSTA, A.A.; SIMMONS, K.F.; SWANSON, R.J.; MATTA, J.F.; VEECK, L.L. New method of evaluating sperm morphology with predictive value for human in vitro fertilization. **Urology**. v. 30, p. 248–251, 1987.

LAHNSTEINER, F.; MANSOUR, N.; PLAETZER, K. Antioxidant systems of brown trout (*Salmo trutta f. fario*) semen. **Animal Reproduction Science** v. 119, p. 314–321, 2010.

LANZAFAME, F.M.; VIGNARE, S.L.; VICARI, E.; CALOGERO, A.E. Treatment of oxidative stress in male infertility. v. 19(5), p. 638–659, **Reproductive BioMedicine Online**. Review, 2009.

LE CLERC, P.; de LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Regulation of proteintyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. **Free Rad Biol Med** v. 22, p. 643–656, 1997.

LENZI, A.; CUALOSSO, F.; GANDINI, L.; LOMBARDO, F.; DONDERO, F. Placebo-controlled, double-blind, cross-over trial of glutathione therapy, in male infertility. **Human Reproduction** v. 9, p. 2044–2050, 1993.

LUCK, M.R.; JEYASEELAN, I.; SCHOLE, R.A. Ascorbic acid and fertility. **Biology of Reproduction**; v.52, p.262–266, 1995.

Referência Bibliográfica

LUVONI, G. C. Gamete cryopreservation in the domestic cat. **Theriogenology** v. 66, p. 101–111, 2006.

MAIA, M.S., BICUDO, S.D., AZEVEDO, H.C., SICHERLE, C.C., SOUSA, D.B., RODELLO, L. Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants **Small Ruminant Research** v.85 p. 85–90. 2009

MARIN-GUZMAN, J.; MAHAN, D.C.; CHUNG, Y.K.; PATE, J.L.; POPE, W.F. Effects of dietary selenium and vitamin E on boar performance and tissue responses, semen quality, and subsequent fertilization rates in mature gilts. **Journal of Animal Science**. v. 75, p. 2994-3003, 1997.

MAXWELL, W.M.C., STOJANOV, T. Liquid Storage of Ram Semen in the Absence or Presence of Some Anti-oxidants. **Reprod. Fertil. Dev.** 8, p.1013–1020, 1996.

McLEOD. The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. **J. American Journal of Physiology**, v.138, n 3, p. 512-518, 1943.

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.

MISHRA, M.; ACHARYA, U.R. Protective action of vitamins on the spermatogenesis in lead-treated Swiss mice. **J. Trace Elem. Med. Biol.** v.18, p.173–178, 2004.

MONTEIRO, J.C.; GONÇALVES, J.S.A.; RODRIGUES, J.A.; LUCIO, C.F.; SILVA, L.C.G; ASSUMPÇÃO, M.E.O.A.; VANNUCHI, C.I. Influence of Ascorbic Acid and Glutathione Antioxidants on Frozen-Thawed Canine Semen. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 44 Suppl 2, p.359-362, 2009.

NISSEN, H.P.; KREYSEL, H.W.; Superoxide dismutase in human semen. **Klinische Wochenschrift** v. 61, p. 63–65, 1983.

OCHSENDORF, F.R. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. **Hum. Reprod. Update** v.5, p. 399–420, 1999.

PADH, H. Vitamin C: never insights into its biochemical functions. **Nutrition Reviews**, New York, v.49, n.3, p.65-70, 1991.

Referência Bibliográfica

PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A.; BICUDO, S.D.; LOPES, M.D.; RAMIRES, P.R.N. Coloração espermática segundo Karras modificado pelo emprego do Barbatimão (*Sthyphnodendrum barbatiman*). In: CONGRESSO DE BIOLOGIA CELULAR, 5., 1986, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro, p.86, 1989..

PASQUALOTTO, F.F.; SHARMA, R.K.; AGARWAL, A.; NELSON, D.R.; THOMAS, A.J.; POTTS, J.M. Seminal oxidative stress in chronic prostatitis patients. **Urology**, v. 55, p.881–885, 2000.

PEÑA A.L.; QUINTELA, L.A.; HERRADON, P.G. Flow cytometric assessment of acrosomal status and viability of dog spermatozoa. **Reproduction of Domestic Animal**, v.34,p:495-502, 1999.

PEÑA, A.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of Equex, one or two step dilution and two freezing thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. **Theriogenology**;v. 54, p.859-875. 2000

PEÑA, A.I. **Supervivencia y fertilidad del semen canino sometido a congelacion-descongelacion**. Lugo. Doctoral thesis, Universidade de Santiago de Compostela, 1997.

PEÑA, F.J., JOHANNISSON,A., WALLGREN, M. H. RODRIGUEZ MARTINEZ. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. **Animal Reproduction Science** 78, p:85–98, 2003.

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. **Mol Reprod Dev**. v.;74(7), p.878-92, 2007

POTTS, R.J.; NEWBURY, C.J.; SMITH, G.; NOTARIANNI, L.J.; JEFFERIES, T.M. Sperm chromatin damage associated with male smoking. **Mutat Res**. v. 25, p. 103-111, 1999.

PURSEL, V.G.; SCHULMAN, L.L.; JOHNSON, L.A. Distribution and morphology of fresh and frozen–thawed sperm in the reproductive tract of gilts after artificial insemination. **Biology of Reproduction** v. 19, p: 69–76, 1978

RIJSSELAERE, T., SOOM, A.V., MAES, D., KRUIF, D. Effect of technical settings on canine semen motility parameters measured by the Hamilton-Thorne analyzer **Theriogenology** v. 60, p. 1553–1568, 2003.

Referência Bibliográfica

ROCHA, A.A.; CUNHA, I.C.N.; EDERLI, B.B.; ALBERNAZ, A.P.; QUIRINO, C.R. Effect of Daily Food Supplementation with Essential Fatty Acids on Canine Semen. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 44 Suppl 2, p.313-315, 2009.

RODELLO, L. **Prevenção do estresse oxidativo pela utilização de TROLOX, catalase e glutatona no processo de congelação de sêmen ovino**. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu – SP.

ROLF, C.; COOPER, T.G.; YEUNG, C.H.; NIESCHLAG, E. Antioxidant treatment of patients with asthenozoospermia or moderate oligoasthenozoospermia with high-dose vitamin C and vitamin E: a randomized, placebo-controlled, double-blind study **Human Reproduction**, v. 14, n. 4, p. 1028-1033, 1999.

RONQUIST, G.; NIKLASSON, F. Uridine, xanthine, and urate contents in human seminal plasma. **Archives of Andrology** v. 13, p. 63–70, 1984

ROOKE, J.A.; SHAO, C. C.; SPEAKE, B.K. Effects of tuna oil on lipid composition of pig spermatozoa and in vitro characteristics of semen. **Reproduction**; v. 121, p. 315–322, 2001

ROSSI, T.; MAZZILLI, R.; DELFINO, M.; DONDERO, F. Improved human sperm recovery using superoxide dismutase and catalase supplementation in semen cryopreservation procedure. **Cell and Tissue Banking**. v.2, p. 9–13, 2001.

SALEH, A.; AGARWAL, A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. **Journal of Andrology**, v.23, p. 737–752, 2002.

SAWAI, K.; FUNAHASHI, H.; NIWA, K. Stage-specific requirement of cysteine during in vitro maturation of porcine oocytes for glutathione synthesis associated with male pronuclear formation. **Biology Reproduction** v. 57, n. 1, p.1-6, 1997.

SCHUFFER, A., MORSHEDI, M., OEHNINGER, S. Cryopreservation of fractionated, highly motile human spermatozoa: effect on membrane phosphatidylserine externalization and lipid peroxidation. **Human Reproduction** v.16 (10), p. 2148-2153, 2001.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. **Eur J Biochem.**; v. 215, p.213–219, 1993.

Referência Bibliográfica

SIKKA, S.C. Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Andrology and Assisted Reproductive Technology. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 1, p.5-18, 2004.

SILVA, A.R., CARDOSO, R.C.S., SILVA, LDM, CHIRINÉA, V.H., LOPES, M.D., SOUZA, F.F. Prognostic value of canine frozen-thawed semen parameters on *in vitro* sperm-oocyte interactions. **Theriogenology** 2005.

SILVA, P.F.N. **Physiology of peroxidation processes in mammalian sperm.** (Tese de doutorado). Utrecht University, 178p. 2006

SOMANI, B.L.; AMBADE, V.; BULAKH, P.M.; SHARMA, Y.V. Elimination of superoxide dismutase interference in fructosamine assay. **Clin Biochem.** v. 32(3),p. 185-1888, 1999.

SONMEZ, M.; TURK, G.; YUCE, A. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats **Theriogenology** v.63 p. 2063–2072, 2005.

STRZEŻEK, J.; FRASER,L.; KUKLIŃSKA,M.; DZIEKOŃSKA,A.; LECEWICZ, M. Effects of dietary supplementation with polyunsaturated fatty acids and antioxidants on biochemical characteristics of boar semen. **Society for Biology of Reproduction** v. 4 (3) p.271-287, 2004.

TAVILANI, H.; GOODARZI, M.T.; DOOSTI, M. et al. Relationship between seminal antioxidant enzymes and the phospholipid and fatty acid composition of spermatozoa. **Reproductive BioMedicine Online** v. 16, p. 649–656, 2008.

TAYLOR, C.T. Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Human Fertility. **Environmental Toxicology and Pharmacology** v.10, p. 189–198, 2001.

THEROND, P.; AUGER, J.; LEGRAND, A.; JOUANNET, P. Alphas-tocopherol in human spermatozoa and seminal plasma:relationships with motility, antioxidant enzymes and leukocytes. **Molecular Human Reproduction** v.2, p. 739–744, 1996.

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

THUWANUT P, CHATDARONG K, TECHAKUMPHU M, AXNER E, The effect of antioxidants on motility, viability, acrosome integrity and DNA integrity of

Referência Bibliográfica

frozen-thawed epididymal cat spermatozoa. **Theriogenology**,:doi:10.1016/j.theriogenology.2008.04.005. 2008.

THUWANUT, P. **The effect of antioxidants on motility, viability, acrosome integrity and DNA integrity of post-thaw epididymal cat spermatozoa.** (Tese de doutorado). Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala, 2007.

VILLEGAS, J.; KEHR, K.; SOTO, L.; HENKEL, R.; MISKA, W.; SANCHEZ, R. Reactive oxygen species induce reversible capacitation in human spermatozoa. **Andrologia**. v. 35, n. 4, p.:227-232, 2003.

WATSON, P.F. Recent development and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assesment of their post-thawing function. **Reproduction and Fertility Development**, v. 7, p.871-891, 1995.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Anim. Reprod. Sci.** , v.60-61, p.481-92, 2000

WATSON, P.F. **The effects of cold shock on sperm cell membranes** In: Morris, E.J., Clark, A. (Eds). *The effects of low temperatures on biological membranes*. London: Academic Press. p.189-218, 1981

WOLFF, H. The biologic significance of white blood cells in semen. **Fertil Steril**, v. 63, p. 1143–1147, 1995.

YOUSEF, M.I.; ABDALLAH, G.A.; KAMEL, K.I. Effect of ascorbic acid and Vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits, **Anim Reprod Sci** , v.76, p.99-111, 2003.

ZAN, LS, HU, JH, LI, QW, WANG, LQ, JIA, YH, ZHU, DN The cryoprotective effect of ascorbic acid supplementation on bovine semen quality. **Anais do International Congress of Animal Reproduction**, P125, 2008.

ZINI, A.; FISCHER, M.A, MAK, E.V.; PHANG, D.; JARVI, K. Catalase-like and superoxide dismutase-like activities in human seminal plasma. **Urol Res**. 30: 321 – 323, 2002.

12. Anexo I

Meio TRIS/Gema de ovo/Glicerol, utilizado como meio controle

TRIS	2,4 g
Ácido Cítrico	1,4 g
Frutose	0,8 g
OEP	1 mL
Sulfato de Amicacina	0,02 g
Glicerol	8 mL
Gema de Ovo	20 mL
Água Destilada	Completar para 100 mL

pH = \pm 6,8

Osmolaridade = \pm 300 mOsmol

Anexo II

Valores do “setup” estabelecido para avaliação do sêmen de cão no sistema CASA (Computer-Assisted Semen Analyzer, HTR-IVOS 10 Analyzer, Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, USA).

VARIÁVEL	VALOR	
Frames por segundo	60 Hz	
Número de frames	50	
Contraste mínimo	40	
Tamanho celular mínimo	4 pixel	
Default	Tamanho celular	5 pixel
	Intensidade celular	45
Células progressivas	VAP	60 $\mu\text{m/s}$
	STR	70%
Células lentas	VAP – Cutoff	30 $\mu\text{m/s}$
	VSL – Cutoff	6,0 $\mu\text{m/s}$

Anexo III

FITC-PSA (L-0770, SIGMA)

Diluição 1 – Solução de Azida de Na	
Azida de Na	200 mg
PBS	20 mL

Diluição 2 – Solução Trabalho (100µg/mL)	
Solução de Azida de Na	20 mL
FITC-PSA	2 mg

Iodeto de Propídio (P-4170, SIGMA)

Solução Trabalho (500µg/mL)	
Iodeto de Propídio	5 mg
PBS	10 mL

Trabalho enviado para o periódico: "Veterinária e Zootecnia"

ISSN: 0102-5716

Normas para publicação no site:

http://www.fmvz.unesp.br/revista/port/art_cient.htm

1 **Avaliação do Estresse Oxidativo no Plasma Seminal de Cães Férteis e Subférteis**
2 **após Suplementação Oral com Vitamina C e E**

3 **Evaluation of Oxidative Stress on Seminal Plasma from Fertile and Subfertile**
4 **Dogs After Oral Supplementation with Vitamin C and E**

5 **Evaluación del estrés oxidativo en el plasma seminal de perros fértiles y subfértiles**
6 **después de la suplementación con vitamina C y E**

7 **Bethania Vieira Lopes¹, Gabriel Augusto Monteiro², Paula Payão Ovídio³,**
8 **Alceu Afonso Brandão Júnior⁴, Maria Denise Lopes⁵**

9
10
11
12
13
14

Apoio financeiro: Fapesp e Royal Canin

¹ Doutoranda em Reprodução Animal da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita”
Campus de Botucatu bethania_lopes@hotmail.com

² Doutorando em Reprodução Animal da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita”
Campus de Botucatu gamonteiro@yahoo.com.br

³ Técnica do laboratório de Nutrologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
ppayao@usp.br

⁴ Professor do departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
alceu@fmrp.usp.br

⁵ Professora Titular do departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita” Campus de Botucatu
denise@fmvz.unesp.br

Endereço para correspondência: Distrito de Rubião Júnior s/n, REPAS - FMVZ – UNESP -
Botucatu. CEP: 18610-000. Telefone (14) 3811-6249

Pesquisa aprovada sem restrições pela Câmara de Ética em Experimentação Animal –
CEEA - da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP Campus de
Botucatu, sob o número 62/2007.

Resumo

1 Os espermatozoides são células altamente susceptível ao estresse oxidativo devido a
2 grande concentração de ácidos graxos na composição de suas membranas. O estresse
3 oxidativo ocorre devido a um desequilíbrio entre as concentrações de substâncias
4 antioxidantes e oxidantes, o que pode levar a perda da capacidade fertilizante do
5 espermatozoide. O objetivo deste trabalho foi avaliar as taxas de peroxidação lipídica e a
6 concentração das substâncias antioxidantes do plasma seminal: Superóxido Dismutase
7 (SOD), catalase, vitaminas C e E de cães férteis e subférteis após uma suplementação oral
8 de vitamina C e E por 60 dias. Para isto, foram utilizados 13 cães de diferentes raças e
9 idades que receberam ração comercial (Max Adulto – Royal Canin) por quatro meses. Nos
10 últimos 60 dias, os animais receberam uma suplementação oral de 500mg de vitamina C e
11 E por 60 dias, a qual foi adicionada a ração. O sêmen foi coletado por manipulação digital
12 do pênis em três momentos, antes (M1), após 30 (M2) e 60 dias (M3) de suplementação. O
13 plasma seminal foi obtido após centrifugação (18000g) do ejaculado e armazenado em
14 tubos tipo *ependorf* em congelador a -20°C. Foram mensurados no plasma seminal o
15 índice de peroxidação lipídica, através da análise das substâncias reativas ao ácido
16 tiobarbitúrico (TBARS), e as concentrações de SOD, catalase, vitamina C e E. A análise de
17 peroxidação lipídica, das concentrações de SOD, catalase e vitamina C foram realizadas
18 em espectrofotômetro em diferentes comprimentos de onda (532, 530, 230 e 520
19 respectivamente) sendo que para a avaliação da SOD utilizou-se um kit comercial
20 (Frutosamina – Labtest®). A concentração da vitamina E foi realizada em aparelho de
21 cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Os resultados mostraram diferença
22 significativa entre os grupos de cães férteis e inférteis apenas no M1 (antes da
23 suplementação oral). Não foi verificado diferença entre os grupos nos demais momentos.
24 Em relação a concentração dos antioxidantes, não foi observado diferença significativa
25 entre os grupos e entre os momentos. Baseado no exposto a suplementação oral com
26 vitamina C e E nas dosagens de 500mg/dia por 60 dias não interferiu nas taxas de
27 peroxidação lipídica (TBARS) e nas concentrações dos antioxidantes.
28 Palavras-chave: Cães, subfertilidade, estresse oxidativo, suplementação oral.

Abstract

32 Sperm cells are highly susceptible to oxidative stress due to high concentration of fatty
33 acid in the composition of their membranes. Oxidative stress occurs due to an imbalance

1 between the concentrations of antioxidants and oxidants, which can lead to the loss of
2 sperm fertilizing ability. The aim of this study was to evaluate the rates of lipid
3 peroxidation and concentration of antioxidants in seminal plasma: Superoxide Dismutase
4 (SOD), catalase, vitamins C and E, from fertile and subfertile dogs after an oral
5 supplementation of vitamin C and E for 60 days. For that, it was used 13 dogs of different
6 breeds and ages that were fed with commercial food (Max Adulto - Royal Canin) for four
7 months. Over the past 60 days, animals received a diet added to oral supplementation of
8 500 mg vitamin C and E for 60 days. Semen was collected by penis digital manipulation in
9 three times before (M1), 30 (M2) and 60 days (M3) of supplementation. Seminal plasma
10 was obtained after centrifugation (18000g) of the ejaculate and stored in *Eppendorff* tubes
11 in a freezer at -20 ° C. It was measured in seminal plasma the index of lipid peroxidation,
12 by analysis of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), and the concentrations of
13 SOD, catalase, vitamin C and E. Analysis of lipid peroxidation, the concentrations of SOD,
14 catalase and vitamin C were performed on a spectrophotometer at different wavelengths
15 (532, 530, 230 and 520 respectively) and for the evaluation of SOD it was used a
16 commercial kit (Fructosamine - Labtest ®). The concentration of vitamin E was performed
17 using a high-performance liquid chromatography (HPLC). The results showed significant
18 differences between groups of fertile and infertile dogs only at M1 (before oral
19 supplementation). There was no difference between groups in other moments. Regarding
20 the concentration of antioxidants, there was no significant difference between groups and
21 between moments. Based on the foregoing oral supplementation with vitamin C and E in
22 dosages of 500 mg / day for 60 days did not affect the rates of lipid peroxidation (TBARS)
23 and concentrations of antioxidants.

24 Keywords: Dogs, subfertility, oxidative stress, oral supplementation.

25 **Resumen**

26 Los espermatozoides son muy sensibles al estrés oxidativo debido a la gran concentración
27 de ácidos grasos presentes en sus membranas. El estrés oxidativo se produce debido al
28 desequilibrio entre las concentraciones de las sustancias antioxidantes y oxidantes, lo que
29 puede generar pérdida en la capacidad fértil de los espermatozoides. El objetivo de este
30 estudio fue evaluar las tasas de peroxidación de lípidos y la concentración de antioxidantes
31 en el plasma seminal: superóxido dismutasa (SOD), catalasa, vitaminas C y E, en perros
32 fértiles y subfértiles después de la suplementación oral de vitamina C y E durante 60 días.
33 Para ello, hemos utilizado 13 perros de diferentes razas y edades que fueron alimentados

1 con una dieta comercial (Max Adultos - Royal Canin) durante cuatro meses. Durante los
2 últimos 60 días, los animales recibieron la dieta comercial en conjunto con una
3 suplementación oral de 500 mg de vitamina C y E durante 60 días. El semen fue colectado
4 3 veces la manipulación digital del pene en tres veces antes (M1), 30 (M2) y 60 días (M3)
5 de la suplementación. El plasma seminal se obtuvo a partir de la centrifugación (18000g)
6 del eyaculado y se almacenó en tubos *Eppendorff* en un congelador a -20°C. En el plasma
7 se midieron la peroxidación lipídica mediante análisis de sustancias reactivas al ácido
8 tiobarbitúrico (TBARS), y las concentraciones de SOD, catalasa, vitamina C y E. Los
9 análisis de peroxidación lipídica, las concentraciones de SOD, catalasa y la vitamina C se
10 realizaron en un espectrofotómetro en diferentes longitudes de onda (532, 530, 230 y 520,
11 respectivamente) y para la evaluación de la SOD utilizó un kit comercial (fructosamina -
12 Labtest ®). La determinación de vitamina E se realizó mediante una cromatografía líquida
13 de alto rendimiento (HPLC). Los resultados mostraron diferencias significativas entre los
14 grupos de perros fértiles e infértiles sólo en M1 (antes de la suplementación oral). No hubo
15 diferencias entre los grupos en otros momentos. En cuanto a la concentración de
16 antioxidantes, no hubo diferencias significativas entre los grupos y entre los tiempos. Con
17 base en lo anterior la suplementación oral con vitamina C y E en dosis de 500 mg / día
18 durante 60 días no afectó los índices de peroxidación lipídica (TBARS) ni las
19 concentraciones de antioxidantes.

20 Palabras-clave: Perros, Subfertilidade, estrés oxidativo, suplementación oral.

21

1 Introdução

2 O espermatozóide possui na composição de sua membrana uma grande quantidade
3 de ácidos graxos poli-insaturados, fato que o torna particularmente susceptível ao processo
4 de estresse oxidativo. O estresse oxidativo é causado por um desequilíbrio entre a
5 concentração de substâncias antioxidantes e das oxidantes, reconhecidas como espécies
6 reativas de oxigênio (ROS) (1). Quando este desequilíbrio ocorre em grandes proporções, o
7 espermatozóide perde sua capacidade fertilizante. O plasma seminal contém moléculas de
8 alto e baixo peso molecular, incluindo antioxidantes enzimáticos como a Superóxido
9 Dismutase (SOD) (2, 3) e a catalase (4) e não enzimáticos como a vitamina C (5) e
10 vitamina E (6). O plasma seminal é considerado, portanto, a principal defesa contra a
11 toxicidade das ROS (7, 8), resguardando o espermatozóide com um sistema antioxidante
12 capaz de preservar sua capacidade fertilizante (9).

13 A diminuição da concentração de ROS ou o aumento do sistema antioxidante reduz
14 o estresse oxidativo e os danos causados por ele. A suplementação oral com moléculas
15 antioxidantes aumenta a concentração dessas substâncias no plasma seminal reduzindo o
16 estresse oxidativo durante a espermatogênese. A análise das substâncias antioxidantes e a
17 avaliação da peroxidação lipídica poderão indicar a taxa de estresse oxidativo ao qual as
18 células espermáticas estão sendo submetidas.

19 O objetivo dessa pesquisa é avaliar as taxas de peroxidação lipídica e a
20 concentração das substâncias antioxidante do plasma seminal: SOD, catalase, vitaminas C
21 e E de cães férteis e subférteis após uma suplementação oral de vitamina C e E por 60 dias.

22 Material e Método

23 Foram utilizados treze (n=13) cães de raças e idades variadas. Nove animais eram
24 provenientes do canil da Polícia Militar de Bauru e quatro de propriedades particulares da
25 cidade de Botucatu. Todos os animais foram alimentados com ração comercial (Maxi

Trabalho científico

1 Adulto – Royal Canin) por quatro meses. Após dois meses do início do fornecimento desta
2 ração, os animais receberam uma suplementação oral de 500mg de vitamina C e 500mg de
3 vitamina E por 60 dias. Antes da suplementação, após 30 dias e 60 dias o sêmen foi
4 coletado e avaliado (M1, M2 e M3, respectivamente). A colheita de sêmen foi realizada
5 pelo método de estimulação peniana descrito por Feldman & Nelson (10). Os animais
6 foram divididos em dois grupos de acordo com o padrão de seu ejaculado: em férteis e
7 subférteis. **Cães férteis:** (n=7) ejaculado com concentração e morfologia espermática
8 dentro dos padrões recomendados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (11).
9 **Cães subférteis:** (n=6) Ejaculado com padrão abaixo do recomendado pelo CBRA, baixa
10 concentração espermática ($< 20 \times 10^6$ spz/mL) e/ ou alto índice de patologias espermáticas
11 ($> 30\%$).

12 O sêmen foi centrifugado a 18.000g por 20 minutos para obtenção do plasma
13 seminal. Em seguida as amostras de plasma seminal foram transferidas para tubo tipo
14 *ependorff* e congeladas a -20°C até o momento de sua análise. No momento das análises
15 (M1, M2 e M3) as amostras de plasma seminal foram descongeladas e submetidas as
16 seguintes avaliações:

17 **Taxa de peroxidação lipídica:** foi avaliada através da mensuração das substâncias
18 reativas ao ácido tiobárbiturico (TBARS). Para esta análise seguiu-se o protocolo descrito
19 por Buege & Aust (12). Este método se baseia na reação de duas moléculas de ácido
20 tiobarbitúrico com uma de malondialdeído (MDA), produzindo um complexo de coloração
21 rósea que pode ser quantificado através de leitura em espectrofotômetro em um
22 comprimento de onda de 532nm. Esta reação ocorre em pH ácido e em temperaturas entre
23 90 e 100°C .

24 Uma alíquota de 100 μL de plasma seminal foi misturada a 200 μL de uma
25 solução de ácido tricloroacético (15%) - ácido tiobarbitúrico (0,375%) - ácido clorídrico

Trabalho científico

1 (0,25N). Aquecido por 15 minutos em água fervente e resfriado em água, centrifugado por
2 10 minutos 1300g .O sobrenadante foi utilizado para quantificar os TBARS em
3 espectrofotômetro (SpectraMax M5, Molecular Devices) em um comprimento de onda de
4 532nm. Os resultados obtidos foram comparados com uma curva padrão de MDA. A
5 concentração dos TBARS foi determinada utilizando-se $1,56 \times 10^5 \times M^{-1}mL^{-1}$ como
6 coeficiente de extinção molar de MDA. Os valores foram expressos em ng de TBARS/mL
7 de plasma.

8 **Mensuração das substancias antioxidantes:**

9 **Superóxido dismutase (SOD):** foi medida indiretamente através do índice de inibição da
10 SOD. Foi utilizado um kit comercial para dosagem de frutossamina (Labtest), proteína
11 consumida pela SOD. A SOD foi portanto, mensurada a partir da concentração de
12 frutossamina no plasma seminal, sem inibição e com inibição da ação da SOD. A análise foi
13 realizada em espectrofotômetro (SpectraMax M5, Molecular Devices) utilizando um
14 comprimento de onda de 530nm, após incubação da amostra a 37°C por 10 minutos e
15 depois realizada duas novas análises, uma após 5 minutos e outra após 10 minutos.

16 Os resultados obtidos sem a inibição da SOD foram considerados como 100%.
17 Para a determinação do valor da SOD, foi realizada uma curva padrão, utilizando-se
18 concentrações pré determinadas de SOD, utilizando a equação: $y = 0,027x + 44,26$. Onde y
19 é a concentração de SOD em ng/mL e x o valor encontrado na porcentagem de inibição da
20 SOD.

21 **Catalase:** Foi determinada em aparelho de espectrofotometria com comprimento
22 de onda de 230nm a 30°C, avaliando-se o consumo de H_2O_2 por 8 minutos (13). O meio de
23 reação continha 10 μ L de plasma seminal, tampão Trisaminometano/EDTA (concentração
24 final de 50nM e 250nM respectivamente), pH 8,0 e 900 μ M de H_2O_2 (concentração final de
25 9,0nM).

1 Para os cálculos de concentração, utilizou-se o valor 0,071M-1cm-1 como
2 coeficiente de extinção molar do H₂O₂. A concentração de catalase foi expressa por ng/mL
3 de plasma seminal.

4 **Vitamina E:** Uma alíquota de 200µL de plasma seminal foi adicionado a 100µL de
5 etanol 100% com Butilhidroxitolueno (BHT) e 100µL de NaOH e homogeneizado em
6 vórtex por 5 segundos. Em seguida adicionou-se 400µL de n-hexano e a mistura foi
7 agitada por 2 minutos. A amostra foi centrifugada a 700 g por 5 minutos e em seguida cada
8 amostra foi inserida em um novo tubo de ensaio contendo 200µL da fase hexânica.

9 As amostras foram secas em fluxo de nitrogênio e ressuspendidas em 200µL de
10 fase móvel. Vinte microlitros deste preparado foi injetado no aparelho de cromatografia
11 líquida de alta performance (HPLC). O comprimento de onda de excitação e emissão foi de
12 292 e 330nm, respectivamente.

13 Para quantificar o valor de vitamina E, 5 injeções do padrão interno (vitamina E
14 em 5 diferentes concentrações: 2,5; 5; 10; 20 e 40 µMol/L) foram introduzidas no aparelho
15 para definir o tempo de retenção e a área média obtida. Foi então obtida a curva padrão que
16 forneceu uma equação, $y = 0.0003x + 0,660$. onde x representa o valor encontrado na área
17 obtida e y a concentração de vitamina E, expresso em µMol/L.

18 **Vitamina C:** Seguiu-se o protocolo proposto por Bessey (14): Adicionou-se 400µL de
19 ácido tricloroacético (5%) em 100µL de plasma seminal. Essa amostra foi centrifugada a 4°
20 C, por 10 minutos a 908g. Em seguida retirou-se 60µL do sobrenadante transferindo essa
21 alíquota para um tubo de ensaio onde adicionou-se 20µL do reagente de cor (DTC –
22 dinitrofenilhidrazina+tiouréia+sulfato de cobre). Este procedimento foi realizado em
23 triplicata. Após 4 horas de reação em banho de água a 37 °C adicionou-se 100µL de H₂SO₄
24 65%. A leitura foi realizada após 20 minutos em espectrofotômetro (SpectraMax M5,

Trabalho científico

1 Molecular Devices), utilizando um comprimento de onda de 520 nm. A concentração de
2 vitamina C foi realizada por meio de uma curva de calibração.

3 Resultados

4 Discussão

5 O plasma seminal é a principal fonte de defesa antioxidante para o
6 espermatozóide (7, 8). A avaliação de TBARS no plasma seminal reflete o índice de
7 estresse oxidativo ao qual este espermatozóide está exposto, podendo ser usado como
8 um indicativo da necessidade ou não de uma suplementação oral com antioxidantes.
9 Assim, objetivou-se neste experimento verificar eventuais diferenças existentes nos
10 níveis de estresse oxidativo entre os animais férteis e subférteis. A hipótese era que no
11 plasma seminal de cães subférteis existia uma maior concentração de TBARS e/ou uma
12 menor concentração de substâncias antioxidantes.

13 Antes da suplementação oral, o grupo dos animais férteis mostrou uma
14 concentração de TBARS superior ($735,20 \pm 153,80$) ao do grupo subfértil ($507,96 \pm$
15 $161,13$), demonstrando que o ejaculado de cães com padrão normal apresenta uma taxa
16 maior de peroxidação lipídica. A adição das vitaminas C e E na ração desses animais
17 modificou esses resultados aumentando talvez a concentração de substâncias
18 antioxidantes no plasma seminal o que foi suficiente para diminuir o TBARS no grupo
19 fértil (Tabela 1).

20 A suplementação da dieta de coelhos com vitamina C, E e a sua associação,
21 promoveu uma diminuição da formação de TBARS, indicando que a suplementação
22 oral de antioxidante reduziu o estresse oxidativo no plasma seminal desses coelhos (15).
23 A mesma situação foi observada em ratos suíços (16). Uma redução da taxa de

1 peroxidação lipídica também foi observada em ratos Wistar quando suplementados
2 apenas com a vitamina C (17).

3 Uma condição importante a ser discutida é a possibilidade dessa maior
4 concentração de TBARS observada no plasma seminal do grupo fértil ser devida a uma
5 concentração espermática também maior nesse grupo; assim quando maior o número de
6 espermatozóide, maior a concentração de ROS e maior concentração de TBARS. Existe
7 também a possibilidade de que outros antioxidantes, não mensurados neste
8 experimento, como a glutathione peroxidase estejam em concentrações mais baixas no
9 grupo fértil, contribuindo assim para um desequilíbrio das concentrações de
10 oxidantes/antioxidantes.

11 Em estudo realizado com homens férteis e subférteis, também foi observado,
12 uma maior taxa de peroxidação lipídica no sêmen de homens férteis (18). Ao contrário,
13 um aumento da concentração de ROS no plasma seminal foi relatado como uma das
14 causas da baixa qualidade do sêmen de humanos (19), hamster (20) e cães (21).

15 Não foi possível detectar a concentração de catalase do plasma seminal dos
16 animais avaliados, corroborando com os resultados de Hatamoto et al. (22), que também
17 não encontraram catalase no plasma seminal de cães da raça Rottweiler. Kawakami et
18 al. (21) detectaram a presença desta enzima no plasma seminal de cães e observaram
19 uma concentração mais baixa em animais com ejaculado abaixo do padrão desejado do
20 que em animais considerados férteis (0,48 x 2,18 u/mg de proteína, respectivamente). A
21 catalase é uma enzima intracelular, por isso não deve estar presente em altas
22 concentrações no plasma seminal (23, 24). Talvez o equipamento usado em nosso
23 experimento não tenha sensibilidade suficiente para detectar pequenas concentrações de
24 catalase.

1 Não houve diferença significativa entre os grupos fértil e subfértil na
2 concentração dos antioxidantes avaliados (SOD, Vitamina C e E) no plasma seminal
3 (Tabelas 2, 3 e 4, respectivamente). Ao contrário dos resultados de Kawakami et al. (21)
4 que relataram uma concentração de SOD significativamente mais baixa no plasma
5 seminal de cães com alterações seminais do que naqueles sem alterações. Estes autores
6 relacionaram a baixa motilidade espermática observada no ejaculado desses animais
7 com a concentração reduzida de SOD. No presente experimento, os cães subfêrteis não
8 apresentavam alteração de motilidade espermática, mas sim de concentração e
9 morfologia espermática; talvez por isso não tenha sido observado diferença significativa
10 na concentração de SOD entre os grupos experimentais (Tabela 2).

11 Não houve diferença significativa, entre os grupos, na concentração dos
12 antioxidantes mensurados (SOD, vitamina C e vitamina E) no plasma seminal, em
13 nenhum momento analisado, indicando, talvez, que a concentração dos antioxidantes
14 utilizados na suplementação oral não tenha sido suficiente para alterar a concentração
15 destas substâncias no plasma seminal. Ao contrário, Kawakami et al. (21) observaram
16 menor atividade de SOD em cães astenozoospermicos do que nos considerados
17 normais. Siciliano et al. (25) também observaram menor atividade de SOD em homens
18 com problemas reprodutivos.

19 Corroborando com os resultados aqui apresentados, não foi observada nenhuma
20 diferença significativa na atividade da SOD no plasma seminal de homens com e sem
21 problemas reprodutivos (26, 27).

22 Em um estudo com cães submetidos a tratamentos com dexametasona e
23 suplementação oral de vitamina E observou-se uma diminuição da concentração de
24 TBARS. Os autores atribuíram seus resultados ao fato de que a suplementação oral com

Trabalho científico

1 vitamina E diminuiu a peroxidação lipídica protegendo a célula contra os efeitos deletérios
2 da peroxidação lipídica (22).

3 Baseado no exposto observou-se que a suplementação oral com vitamina C e E
4 nas dosagens de 500mg/dia por 60 dias não modificou o índice de peroxidação lipídica
5 (TBARS) e nas concentrações dos antioxidantes avaliados nos dois grupos estudados e
6 nos tres momentos avaliados (antes, durante e após a suplementação).

7 Referências:

- 8 1 Sikka SC. Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Andrology and Assisted
9 Reproductive Technology. J Androl. 2004; v. 25 (1): 5-18.
- 10 2 Nissen HP, Kreysel HW. Superoxide dismutase in human semen. Klin Wochenschr.
11 1983; v. 61:63–65.
- 12 3 Kobayashi T, Miyazaki T, Natori M, Nozawa, S. Protective role of superoxide
13 dismutase in human sperm motility: superoxide dismutase activity and lipid peroxide in
14 human seminal plasma and spermatozoa. Hum Reprod. 1991; v. 6: 987–991.
- 15 4 Lahnsteiner F, Mansour N, Plaetzer K. Antioxidant systems of brown trout (*Salmo*
16 *trutta f. fario*) semen. Animal Reproduction Science. 2010; v.119: 314–321.
- 17 5 Thiele JJ, Friesleben HJ, Fuchs J, Ochsendorf FR. Ascorbic acid and urate in human
18 seminal plasma: determination and interrelationships with chemiluminescence in
19 washed semen. Hum Reprod. 1995; v. 10: 110–115.
- 20 6 Therond P, Auger J, Legrand A, Jouannet P. Alphatocopherol in human spermatozoa
21 and seminal plasma:relationships with motility, antioxidant enzymes and leukocytes.
22 Mol Hum Reprod. 1996; v.2: 739–744.
- 23 7 Lenzi A, Cualosso F, Gandini L, Lombardo F, Dondero F. Placebo-controlled,
24 double-blind, cross-over trial of glutathione therapy, in male infertility. Hum Reprod.
25 1993; v. 9: 2044–2050.

Trabalho científico

- 1 8 Balercia G, Armeni T, Mantero F, Principato G, Regoli F. Total oxyradical
2 scavenging capacity toward different reactive oxygen species in seminal plasma and
3 sperm cells. *Clin Chem Lab Med* 2003; v. 41(1): 13-19.
- 4 9 Kim JG, Parthasarathy S. Oxidation and the spermatozoa. *Semin Reprod Endocrinol.*
5 1998; v.16(4): 235-239.
- 6 10 Feldman EC, Nelson RW. Canine and feline endocrinology and reproduction.
7 Philadelphia: W.B. Saunders, 487p, 2004.
- 8 11 CBRA-Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e
9 avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte, 65p. (Elaborado conforme convênio
10 CBRA/MA n. 017/1998), 1998.
- 11 12 Buege JA, Aust SD. Microsomal Lipid peroxidation. *Method Enzymol.* 1978; v.52:
12 302-310.
- 13 13 Beutler E. Red cell metabolism, 2nd ed., Greene & Straton; 1975. p. 89-90.
- 14 14 Bessey OA. Ascorbic acid. Microchemical methods. In: *Vitamin Methods.* New
15 York, Academic Press. 1960; v.1, p.303.
- 16 15 Yousef MI, Abdallah GA, Kamel KI. Effect of ascorbic acid and Vitamin E
17 supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. *Anim*
18 *Reprod Sci.* 2003; v.76: 99-111.
- 19 16 Mishra M, Acharya UR. Protective action of vitamins on the spermatogenesis in
20 lead-treated Swiss mice. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2004; v.18: 173-178.
- 21 17 Sonmez M, Turk G, Yuce A. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm
22 quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. *Theriogenology.*
23 2005; v.63: 2063-2072.
- 24 18 Schuffer A, Morshedi M, Oehninger S. Cryopreservation of fractionated, highly
25 motile human spermatozoa: effect on membrane phosphatidylserine externalization and
26 lipid peroxidation. *Hum Reprod.* 2001; v.16 (10): 2148-2153.

Trabalho científico

- 1 19 Aitken RJ, Clarkson JS, Hargreave TB. et al. Analysis of the relationship between
2 defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of
3 oligozoospermia. *J. Androl.* 1989; v. 10: 214–220.
- 4 20 Chen H, Cheung MPL, Chow PH, O WS. Oxidative stress on the genomic integrity
5 of epididymal and uterine sperm produced by male with all major accessory sex glands
6 removed in the golden hamster. *Reproduction.* 2001; v. 27: 87.
- 7 21 Kawakami E, Takemura A, Sakuma M, Takano M, Hirano T, Hori T. Superoxide
8 Dismutase and Catalase Activities in the Seminal Plasma of Normozoospermic and
9 Asthenozoospermic Beagles. *J Vet Med Sci.* 2007; v.69 (2): 133 – 136.
- 10 22 Hatamoto LK, Sobrinho BCA, Nichi M, Barnabe VH, Barnabe RC, Cortada CNM.
11 Effects of Dexamethasone Treatment (to Mimic Stress) and Vitamin E oral
12 Supplementation on the Spermogram and on Seminal Plasma Spontaneous Lipid
13 Peroxidation and Antioxidant Enzyme Activities in Dogs. *Theriogenology.* 2006; v.66:
14 1610–1644.
- 15 23 Ball BA, Medina V, Gravance CG, Baumber J. Effect of Antioxidants on
16 Preservation of Motility, Viability and Acrosomal Integrity of Equine Spermatozoa
17 During Storage at 5 °C. *Theriogenology.* 2001; v. 56: 577–589.
- 18 24 Calamera JC, Fernandez PJ, Buffone MG, Acosta AA, Doncel GF. Effects of Long-
19 Term in Vitro Incubation of Human Spermatozoa: Functional Parameters and Catalase
20 Effect. *Andrologia.* 2001; v. 33: 79–86.
- 21 25 Siciliano L, Tarantino P, Longobardi F, Rago V, De Stefano C, Carpino A. Impaired
22 seminal antioxidant capacity in human semen with hyperviscosity or
23 oligoasthenozoospermia. *J. Androl.* 2001; v. 22: 798–803.
- 24 26 Hsieh Y, Chang C, Lin, CS. Seminal malondialdehyde concentration but not
25 glutathione peroxidase activity is negatively correlated with seminal concentration and
26 motility. *Int. Journal of Biological Sciences.* v. 2, p. 23–29, 2006.

Trabalho científico

- 1 27 Khosrowbeygi A, Zarghami N. Levels of oxidative stress biomarkers in seminal
- 2 plasma and their relationship with seminal parameters. BMC Clinical Pathology. 2007;
- 3 v. 7: p.6. 2007