

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 11/08/2017.

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

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

**Paula Andressa Pennacchi Savi
Médica Veterinária**

2016

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

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

Paula Andressa Pennacchi Savi

Orientador: Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente

Coorientadoras: Dr^a. Eliandra Antônia Pires Büttler

Dr^a. Juliana Corrêa Borges

Dr^a. Maria Emília Franco Oliveira

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

2016

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

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

Orientador: Wilter Ricardo Russiano Vicente

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

Bibliografia

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

CDU 619:612.6:636.7

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTORA: PAULA ANDRESSA PENNACCHI SAVI

ORIENTADOR: WILTER RICARDO RUSSIANO VICENTE

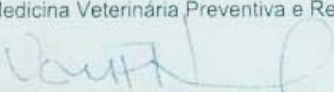
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em MEDICINA VETERINÁRIA, área: REPRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:
COORDENADORA: JULIANA CORREA BORGES SILVA
COORDENADORA: ELIANDRA ANTONIA PIRES BUTTLER
COORDENADORA: MARIA EMÍLIA FRANCO OLIVEIRA


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


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


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


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


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

Jaboticabal, 11 de fevereiro de 2016.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

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

SUMÁRIO

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

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

LISTA DE TABELAS

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

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

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

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

LISTA DE FIGURAS

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

LISTA DE ABREVIATURAS

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

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

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

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

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

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

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

1. INTRODUÇÃO

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

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

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

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

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

8. CONCLUSÕES

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

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

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MARTINS, M.I.M.; JUSTINO, R.C.; SANT'ANNA, M.C.; TRAUTWEIN, L.G.C.; SOUZA, F.F. Comparison of Two Different Extenders for Cryopreservation of Epididymal Dog Sperm, **Reproduction Domestic Animal**, v.47 (Suppl. 6), p.293–294, 2012.

MICHAEL, A.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.; SARATSIS, P.; BOSCOS, C. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa, **Theriogenology**, v.68, p.204–212, 2007.

MICHAEL, A.J.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E.A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.J.; SARATSIS, P.; VERVERIDIS, H.N.; BOSCOS, C.M. Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa, **Animal Reproduction Science**, 112, 119-135, 2009.

MICHAEL, A.J.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E.A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.J.; SARATSIS, P.; VERVERIDIS, H.N.; BOSCOS, C.M., Effect of N-acetyl-L-cysteine supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa, **Reproduction Domestic Animal**, v.45, p.201-207, 2010.

MICKLE, D.A.; WEISEL, R.D. Future directions of vitamin E and its analogues in minimizing myocardial ischemia-reperfusion injury and its analogues in minimizing myocardial ischemia-reperfusion injury. **Canadian Journal of Cardiology**, v.9, p.89–93, 1993.

MONTEIRO, J. C., GONCALVES, J. S., RODRIGUES, J. A., LUCIO, C. F., SILVA, L. C. & ASSUMPCAO, M.E. Influence of ascorbic acid and glutathione antioxidants on frozen-thawed canine semen. **Reproduction Domestic Animal**, v.44, n.2, p.359-362, 2009.

MORETTI, E.; CASTELLINI, C.; MOURVAKI, E.; CAPITANI, S.; GEMINIANI, M.; MORTIMER, S.T.; MAXWELL, W.M.C. Effect of medium on the kinematics of frozen-thawed ram spermatozoa. **Reproduction** v.127, p.285–291, 2004.

MURADÁS, P.R.; WEISS, R.R.; KOZICKI, L.E.; GRANEMANN, L.C.; SANTOS, I.W.; PIMPÃO, C.T. Alguns parâmetros de viabilidade de espermatozoides equinos colhidos por vagina artificial e por lavagem da cauda do epidídimo. **Archives of Veterinary Science**, v.11, p.69-74, 2006.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ANEXO A

Protocolo Anestésico:

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

ANEXO B

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

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

ANEXO C

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

I - Solução estoque de DIC

DIC - 9,2mg

DMSO - 20mL

II - Solução estoque de IP

IP - 10mL

NaCl 0,9% - 20mL

III - Solução estoque de Formaldeído

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

VI - Solução estoque de citrato de sódio a 3%

Citrato de sódio - 3g

Solução fisiológica - 100mL

V - Solução de trabalho

DIC - 20 μ L

IP - 10 μ L

Formaldeído - 10 μ L

Solução IV - 960 μ L

ANEXO D

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

ANEXO E

Solução de TBA para a realização do teste de lipoperoxidação:

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