

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

*BIS-CARBOXIETIL SESQUIÓXIDO GERMÂNIO COMO  
ANTIOXIDANTE NA CRIOPRESERVAÇÃO  
DE SÊMEN BOVINO*

**TAIRINI ERICA DA CRUZ**

BOTUCATU –SP

Abril – 2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

*BIS-CARBOXIETIL SESQUIÓXIDO GERMÂNIO COMO  
ANTIOXIDANTE NA CRIOPRESERVAÇÃO  
DE SÊMEN BOVINO*

**TAIRINI ERICA DA CRUZ**

Defesa da Dissertação de Mestrado  
apresentada ao Programa de Pós-  
graduação em Biotecnologia Animal  
para obtenção do título de Mestre em  
Reprodução Animal.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Eunice Oba

Coorientador: Prof. Dr. Alicio Martins  
Júnior

BOTUCATU – SP

Abril, 2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Cruz, Tairini Erica da.

Bis-Carboxyethyl Sesquioxido Germânio como antioxidante da criopreservação de sêmen bovino / Tairini Erica da Cruz. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Eunice Oba

Coorientador: Alicio Martins Júnior

Capes: 50504002

1. Antioxidantes. 2. Espécies reativas de oxigênio. 3. Criopreservação. 4. Análise do sêmen. 5. Bovinos.

Palavras-chave: antioxidante; espécie reativa de oxigênio; meio diluente; qualidade espermática.

Nome da Autora: Tairini Erica da Cruz

Título: BIS-CARBOXIETIL SESQUIÓXIDO GERMÂNIO COMO ANTIOXIDANTE NA  
CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN BOVINO

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Alicio Martins Júnior  
Coorientador  
Departamento de Biotecnologia da Reprodução Animal  
FMVA – UNESP – Araçatuba/SP

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira  
Membro  
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária  
FMVZ – UNESP – Botucatu/SP

Prof. Dr. Marcelo George Mungai Chacur  
Não Credenciado no Programa e de fora da FMVZ  
Faculdade de Ciências Agrárias - UNOESTE  
Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, São Paulo

Data da Defesa: 25 de Abril de 2019

*Dedico este trabalho...*

Aos meus pais, Maria Aparecida Lázaro da Cruz e Francisco Assis da Cruz, donos do amor mais sincero deste mundo. Responsáveis pela minha caminhada e dedicação, são as luzes que me guiam nesse caminho; com certeza, sem eles, nada disso teria se realizado.

Ao meu irmão Taison, por ter tornado minha ausência menos árdua e por ter se dividido para auxiliar meus pais nessa jornada.

Amo vocês!

## *Agradecimentos*

Agradeço...

A Deus, por ser meu guia e esperança, sempre me mostrando o que é amar, crer e esperar. Por ter me proporcionado cada dia maravilhoso, cada escolha sabiamente ouvida e principalmente nunca ter me abandonado.

Aos meus pais por batalharem por mim e para mim, sempre acreditando em minha capacidade e sempre me mostrando o caminho do amor.

A toda minha família, que de alguma forma, torceram por essa e tantas outras conquistas. Amor incondicional, CRUZ!

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Alicio Martins Júnior por toda dedicação, aprendizado adquirido e conselhos ouvidos. Foi quem me guiou em terra, sempre transmitindo imensa empatia e solidariedade. Foi o principal responsável por essa realização e principalmente por não ter me deixado desistir nunca. Sou e serei sempre muito grata a ti.

A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eunice Oba, pelo voto de confiança, pela torcida, imensa ajuda na elaboração de todo o projeto. Uma pessoa incrivelmente forte, quem eu sempre irei me espelhar.

A Universidade Estadual Paulista – UNESP – Botucatu e a todos os membros do setor da Biotecnologia da Reprodução Animal. Meu grande reconhecimento!

A Universidade Estadual Paulista – UNESP – Araçatuba e todos os professores, funcionários e amigos.

A Fernanda Nunes Marqui, amiga de laboratório. Uma pessoa em que me espelho muito, ícone de dedicação e fé! Obrigada!

Ao Fernando Polizel pela ajuda prestada, grande colega de profissão e amigo!

A Magna, cuja ajuda foi essencial, não apenas auxiliando no laboratório, mas sempre ajudando com uma boa conversa e torcida.

Aos meus amigos Adriana, Laíse, Renata, Thainá, Jéssica, Ana Carolina e Carlos Eduardo. Sempre foram pessoas essenciais na minha, independente da distância, sempre estivemos unidos.

As pessoas do Departamento de Reprodução Animal da UNESP de Botucatu, por sempre me socorrem nas horas de aflição, pela amizade conquistada! Em especial a Mariana, a Verônica e a Patrícia! Sem vocês eu não tinha chegado até aqui!

A todo corpo docente responsável pelo aprofundamento teórico e prático adquiridos na área de biotecnologia da Reprodução Animal, com o qual tive contato durante o cumprimento das disciplinas optativas do mestrado. Vocês são luz e esperança!

Aos proprietários e funcionários das empresas ligadas diretamente à realização do projeto de pesquisa: Master Fertility Reprodução Animal, Tairana Central de Inseminação Artificial, e Bothupharma<sup>®</sup>.

A Tatiana, médica veterinária responsável da Central de Inseminação Artificial Tairana.

Ao médico veterinário Yuri Tani Utsunomiya pela paciência e essencial ajuda nas análises estatísticas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Serei eternamente Grata!

Obrigada!

## *Lista de abreviações e siglas*

°C: graus Celsius

µg/mL: micrograma por mililitro

µg: micrograma

µL: microlitro

µM/L: micro mol por litro

µm/s: micrometros por segundo

µm: micrômetro

AA-: ausência de ácido aracdônico

AA+: presença de ácido aracdônico

AGPI: ácidos graxos poli-insaturados

ALH: amplitude do deslocamento lateral da cabeça

ANOVA: Análise de Variância

ATP: adenosina trifosfato

BCF: batimento flagelar

CaCl<sub>2</sub>: cloreto de cálcio

COX 1: ciclo-oxigenase-1

DHE: Dihydroethidium

DHR: Dihydrorhodamine 123

DNA: ácido desoxirribonucleico

DNA: ácido desoxirribonucleico

EPM: Erro padrão da média

ERN: espécies reativas de nitrogênio

EROs: Espécies reativas de oxigênio

Fe<sup>2+</sup>: íon ferro

FIV: fertilização *in vitro*

FPS: frames por segundo

Ge: Germânio

Ge132: Bis-carboxietil sesquióxido germânio

Ge-O: germânio e oxigênio

GeO<sub>2</sub>: Dióxido de germânio

GPx: Glutathione peroxidase

G-Q: Germânio com Quercetin

GSH: Glutathione

GSH-Rd: glutathione reductase

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrogênio

HClO: ácido hipocloroso

HO<sub>2</sub><sup>·</sup>: radical hidroperoxila

HSD: “post hoc Honest Significant Difference”

Hz: Hertz

IA: Inseminação artificial

IP: iodeto de propídio

KCl: Cloreto de potássio

Kg: quilograma

LDL: lipoproteínas de baixa densidade

LIN: linearidade

M5: momento de análise 5 minutos

M60: momento de análise 60 minutos

MA: momento da análise

mg: miligrama

MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio

min: minutos

MIV: maturação *in vitro*

mL: mililitro

mM: milimol

MP: motilidade progressiva

MPAI: membrana plasmática e acrossomal íntegras

MT: motilidade total

mW: megawatt

NaCl: cloreto de sódio

NADPH: Fosfato de dinucleotídio de nicotinamida e adenina

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: Fosfato monossódico

NaHCO<sub>3</sub>: Bicarbonato de Sódio

nm: nanômetro

NO: óxido nítrico

NR: não radicais

NRF<sub>2</sub>: fator nuclear derivado de eritrócito 2

O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Anion superóxido

O<sub>3</sub>: ozônio

OH : Radical hidroxila

PIV: Produção *in vitro*

PKC: proteína quinase C

PLM: peroxidação lipídica da membrana

PLMAA-: peroxidação lipídica da membrana sem ácido aracdônico

PLMAA+: peroxidação lipídica de membrana com ácido aracdônico

PMM: potencial da membrana mitocondrial

PVA: álcool polivinílico

SDM: espermatozoides sem desestabilização da membrana plasmática

SH-SY5Y: células de linhagem neuronais humanas

SOD: superóxido dismutase

STR: retilinearidade

u: unidade de massa atômica

UA: Unidade arbitrária

VAP: velocidade média de trajeto

VCL: velocidade curvilínea

VSL: velocidade progressiva

YP: Yo-Pro

## *Lista de Tabelas*

### *Capítulo 2*

TABELA 1. Efeito do Ge132 adicionado ao meio de congelamento de sêmen bovino diluído e mantido a 33 °C/30 min (D) ou diluído e imediatamente refrigerado (R) sobre as características morfofuncionais espermáticas avaliadas com sondas fluorescentes em citômetro de fluxo, pós-descongelamento.

TABELA 2. Efeito do Ge132 suplementado ao meio de congelamento de sêmen bovino sobre a peroxidação lipídica da membrana espermática pós-descongelamento na presença (AA+) ou ausência (AA-) do ácido aracdônico.

TABELA SUPLEMENTAR S1. Valores da média  $\pm$  EPM da motilidade e cinética espermática dos grupos de tratamento e controle de amostras de sêmen conforme o momento da análise (MA; 5 e 60 minutos) pós-descongelamento.

## *Lista de Figuras*

### *Capítulo 1*

FIGURA 1- A, B, C. (A) Reação de Fenton. (B) Reação de Haber-Weiss. (C) Produção de OH<sup>•</sup> a partir do peroxinitrito. Fonte: autoria própria.

### *Capítulo 2*

FIGURA SUPLEMENTAR S1. A-B. Distribuição das variáveis espermáticas analisadas. Os valores abaixo de cada BoxPlot representam o coeficiente de assimetria da respectiva variável. (A) Distribuição de dados não transformados. (B) Distribuição após a transformação “Box-Cox” das variáveis com alta assimetria. Motilidade total (MT; %), motilidade progressiva (MP; %), velocidade curvilínea (VCL;  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade progressiva (VSL;  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade média de trajeto (VAP;  $\mu\text{m/s}$ ), amplitude do deslocamento lateral da

cabeça (ALH;  $\mu\text{m}$ ), batimento flagelar (BCF; Hz), linearidade (LIN; %) e retilinearidade (STR; %).

FIGURA 1. Arranjo esquemático das etapas de preparo das amostras seminais no pré-congelamento

FIGURA 2. Teste de Tukey's honest para determinar diferenças estatísticas entre as variáveis de cinética espermática para os efeitos de tratamento e momento da análise espermática ( $P < 0,05$ ) no modelo da ANOVA. Os elementos que estão fora da diagonal representam diferenças médias (eixo x – eixo y) entre os tratamentos (R0, R500, R1000, D0, D500, D10000), enquanto que os elementos presentes na diagonal representam diferenças médias para o mesmo grupo no momento da análise espermática, pós-descongelamento (eixo x: M5 e eixo y: M60). Somente são exibidos os gráficos das variáveis que apresentaram diferença significativa (ver legenda). Motilidade total (MT; %), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH;  $\mu\text{m}$ ), linearidade (LIN; %) e progressividade (STR; %).

FIGURA SUPLEMENTAR S2. Valores de coeficiente de assimetria de cada “Box Plot” para as variáveis espermáticas morfofuncionais em citometria de fluxo, apresentando distribuição normal. Membrana plasmática e acrossomal íntegra (MPAI; %), sem desestabilização de membrana plasmática (SDM; %), peroxidação lipídica da membrana sem ácido aracdônico (PLM AA-; UA), peroxidação lipídica da membrana com ácido aracdônico (PLM AA+; UA), produção de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ; UA), produção de ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ , UA) e potencial de membrana mitocondrial (PMM; UA).

# SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1.....	1
1.0 Introdução e justificativa.....	2
2.0 Revisão de literatura.....	3
2.1 Espermatozoide.....	3
2.2 Espécies reativas de oxigênio, radicais livres e antioxidantes.....	5
2.3 Bis-carboxietil sesquióxido germânio (Ge132).....	11
3.0 Referências.....	14
CAPÍTULO 2.....	26
ARTIGO.....	27
RESUMO.....	28
ABSTRACT.....	29
1.0 Introdução.....	30
2.0 Materiais e Métodos.....	31
2.1 Animais e colheita de sêmen.....	31
2.2 Análise espermática pré-congelamento.....	31
2.3 Preparo de sêmen pré-congelamento.....	31
2.4 Análise computadorizada de motilidade e cinética espermática.....	32
2.5 Análise morfofuncional do espermatozoide em citômetro de fluxo.....	33
2.6 Análise estatística.....	34
3.0 Resultados.....	35
4.0 Discussão.....	39
5.0 Referências.....	47
CAPÍTULO 3.....	54
1.0 Considerações finais.....	55

Cruz, T. E. **ARTIGO: Efeitos do Bis-carboxietil sesquióxido germânio (Ge132) adicionado ao meio de criopreservação de sêmen bovino sobre as características espermáticas morfofuncionais.** Botucatu, 2019. 55p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

## **RESUMO**

Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos de diferentes concentrações de Bis-carboxietil sesquióxido germânio (Ge132), adicionado ao meio de congelamento de sêmen bovino, mantido ou não sob prévia incubação, sobre as características espermáticas avaliadas, pós-descongelamento. Nove ejaculados de três touros foram misturados e divididos em grupo D (sêmen diluído e incubado a 33 °C por 30 minutos antes da refrigeração) e R (sêmen refrigerado a 4 °C imediatamente após a diluição). Ambos o grupos foram suplementados com 0, 500 e 1000 µg/mL de Ge132, resultando nos subgrupos experimentais D0, R0, D500, D1000, R500 e R1000. Após congelamento, as amostras de sêmen foram descongeladas e avaliadas aos 5 e 60 minutos, quanto a motilidade, velocidade e alterações morfofuncionais espermáticas. Os dados foram analisados, considerando-se a diferença entre os grupos e entre os momentos de avaliação. Maior valor para motilidade total ( $P<0,05$ ) foi obtido no R0 em comparação com o R1000, D500 e D0. As análises realizadas aos 5 e 60 minutos revelaram diminuição dos valores da motilidade total no R500 e no R1000 e no D0, D500 e R500 para a ALH. Além disso, os valores da LIN aumentaram ( $P<0,05$ ) no D1000, da mesma forma que a diferença para a STR entre os momentos foi maior no R500, R1000 e D1000. Maior porcentagem ( $P<0,05$ ) de células com integridade de membrana foi observada no R500 do que no D0, D1000 e R1000, assim como para células sem desestabilização de membrana, a qual R500 apresentou maior porcentagem do que D1000. Menor geração de  $O_2^{\cdot-}$  ocorreu no R0, sendo que nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos para  $H_2O_2$  e potencial de membrana mitocondrial. Após indução de estresse oxidativo com ácido aracdônico, maior ( $P<0,05$ ) intensidade de fluorescência para a peroxidação lipídica foi observada nos subgrupos com o ácido, porém, dentro de cada grupo, menor peroxidação foi observada no D1000 do que no R0 na ausência ou presença do ácido. De modo geral, nenhum efeito antioxidante marcante foi observado após a adição de Ge132 ao meio de congelamento de sêmen. Entretanto, algumas características de velocidade foram incrementadas, assim como, certa proteção à membrana espermática foi pronunciada, permitindo a diminuição da peroxidação lipídica de membrana.

Palavras-chave: antioxidante, espécie reativa de oxigênio, meio diluente, qualidade espermática.

Cruz, T. E. **Effects of Bis-carboxyethyl sesquioxide germanium (Ge132) added in bovine semen freezing extender on the sperm morphofunctional characteristics**. Botucatu, 2019. 55p. Thesis (Master degree) – University of veterinary medicine and animal science, Botucatu, São Paulo State University.

## ABSTRACT

This study aimed to investigate the effects of different concentrations of Bis-carboxyethyl sesquioxide germanium (Ge132) added to a bovine freezing medium, maintained or not under previous incubation, on frozen/thawed sperm characters. Nine bull ejaculates were pooled and divided into group D (ejaculate was diluted and kept at 33 °C for 30 min before cooling) and R (ejaculate was diluted and immediately cooled at 4 °C). Both of groups were added with 0, 500, and 1000 µg/mL of Ge132, forming the experimental groups D0, R0, D500, D1000, R500, and R1000. After freezing, the sperm samples were thawed and assessed at 5 and 60 minutes for motility, velocity and morphological/functional characteristics. The data were expressed taking into account a difference between the groups and between the moments of analysis. Higher ( $P<0.05$ ) mean values were obtained in R0 for total motility in comparison to R1000, D500, and D0. The analyzes at 5 and 60 minutes revealed a significant decreased for total motility in R500 and R1000, as well as, in D0, D500 and R500 for ALH. However, mean values for LIN increased ( $P<0.05$ ) in D1000, similarly that the difference for STR between moments was higher in R500, R1000 and D1000. Greater proportions ( $P<0.05$ ) for acrossomal and plasmatic membrane integrity were observed in R500 than in D0, D1000 and R1000, as well as for without membrane destabilization than in D1000. Lower production of  $O_2^{\cdot-}$  occurred in R0, with no significant differences among groups for  $H_2O_2$  and mitochondrial membrane potential. After oxidative induction test with aradonic acid, higher ( $P<0.05$ ) fluorescence intensity was found for lipid membrane peroxidation in subgroups with acid. Regarding to the values within groups, lower results was measured for peroxidation in D1000 compared to R0, either in the presence or absence of acid. On overall, no remarkable antioxidant effect was observed after Ge132 addition to the semen freezing extender. However, as some sperm velocity characteristics were improved, as well as a such protection to the sperm membrane was pronounced, allowing the reduction of membrane lipid peroxidation.

**Keywords:** antioxidant, extender, reactive oxygen species, sperm quality.

# Capítulo 1

*Primeiro, lembrem-se de olhar para as estrelas lá no alto e não para seus pés lá embaixo. Dois, nunca desista do seu trabalho. O trabalho lhe dá sentido e propósito, e a vida é vazia sem isso. Três, se você for afortunado a ponto de encontrar amor, lembre-se de que ele está ali e nunca o jogue fora.”*

*Stephen Hawking*

## 1.0 Introdução e justificativa

A criopreservação do sêmen é uma ferramenta importante para o aperfeiçoamento de biotecnologias reprodutivas nas áreas da ciência animal e humana. O desenvolvimento da técnica permitiu o armazenamento de células espermáticas, funcionais, para posterior utilização, por exemplo, em programas de inseminação artificial (OMBELET; VAN ROBAYS, 2015). Além disso, proporcionou a criação de estratégias para o melhoramento genético de rebanhos bovinos e o desenvolvimento de bancos de sêmen para espécies de animais ameaçadas de extinção (GOMEZ-ARRONES et al., 2018).

Protocolos utilizados na criopreservação espermática têm sido modificados, buscando disponibilizar o maior número possível de doses de sêmen de touros geneticamente superiores e com alta capacidade de fertilização, sendo possível a utilização de sêmen sexado (UNDERWOOD et al., 2010). As modificações objetivam preservar a qualidade espermática, pós-descongelamento, mantendo-se a motilidade e a integridade da membrana plasmática, combatendo o estresse induzido pelo desequilíbrio osmótico, abruptas alterações da temperatura (SIEME; OLDENHOF; WOLKERS, 2016) e elevada produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (ORTEGA et al., 2009).

Em decorrência da necessidade de se aprimorar a qualidade da fração espermática viável criopreservada (ALCAY et al., 2015), inúmeros antioxidantes, como coenzima Q10, vitamina E (ROSSI; FALOMO; MANTOVANI, 2016), ácido aspártico (MACCHIA et al., 2010), resveratrol (GARCEZ et al., 2010) quercetin (SILVA et al., 2018) e crocin (SAPANIDOU et al., 2015) têm sido adicionados aos meios de refrigeração e congelamento de sêmen, em várias espécies. Entretanto, existe dificuldade na determinação dos mecanismos de ação específicos de cada antioxidante e do estabelecimento da concentração a ser utilizada nos meios de refrigeração e/ou congelamento de sêmen (MATA-CAMPUZANO et al., 2012).

O bis-carboxietil sesquióxido germânio (Ge132) é um composto organometálico com elevada atividade biológica e baixa toxicidade (WADA et al., 2018), sendo que a atividade antioxidante foi primeiramente relatada, quando de sua utilização no tratamento de lesões hepáticas induzidas em cobaias (YANG; KIM, 1999) e em macacos (TEZUKA et al., 2017). Quando testado em cultivo celular, a adição do Ge132 em meio de maturação de oócitos suínos resultou em aprimoramento da qualidade oocitária (KIM et al., 2015), além de efetiva ativação de mecanismos de defesa anti-apoptóticos associados aos genes específicos para o desenvolvimento embrionário de oócitos suínos (KIM et al., 2017).

A ação antioxidante do Ge132 está relacionada à sua estrutura química, a qual é caracterizada por pontes de ligação entre o germânio e oxigênio (Ge-O) (LI et al., 2012), bem como ao arranjo de elétrons externos ( $4s^24p^2$ ) do átomo de Ge. Tais conformações estruturais permitem, respectivamente, a captura e transferência de elétrons desemparelhados no meio celular (WADA et al., 2018). Ademais, o Ge132 foi descrito como quelante de metais de transição (WAKABAYASHI, 2001), interferindo nas reações do metabolismo celular e desta forma, o ferro, por exemplo, responsável pela produção do  $OH^{\cdot}$  pela reação de Fenton (METZENDORF; LIND, 2010; MORALES; SYLVESTER; GRISWOLD, 1987).

Com base na vasta revisão de literatura consultada, nenhum relato científico tem sido descrito em relação à utilização do Ge132 na refrigeração e/ou congelamento de sêmen, em qualquer espécie. Apenas uma menção sobre seu efeito protetor, *in vivo*, sobre a morfologia da cabeça do espermatozoide humano (GERBER; LÉONARD, 1997). Sendo assim, o objetivo foi investigar os efeitos de diferentes concentrações de Ge132, adicionado ao meio de congelamento de sêmen bovino, mantido ou não sob prévia incubação, sobre as características de cinética e integridade morfofuncional das membranas espermáticas, bem como produção de espécies reativas de oxigênio.

## **2.0 Revisão de Literatura**

### **2.1 Espermatozoide**

A função do espermatozoide culmina com a fertilização e consequente transferência de seu genoma e, para tanto, é formado por estruturas altamente especializadas. O processo de produção dos espermatozoides é chamado de espermatogênese, ocorrendo no interior dos túbulos seminíferos logo no início da fase fetal, a partir de divisões meióticas e mitóticas das células germinativas (WESTERN et al., 2008). A cabeça do espermatozoide é constituída pela porção apical, pré-equatorial, equatorial e pós-equatorial, sendo responsável pelo armazenamento e transmissão do material genético. É composta também pelo acrossoma, o qual é formado por uma camada dupla de membranas, contendo enzimas hidrolíticas encarregadas da penetração do espermatozoide no oócito (BLOBEL et al., 1992). Nessa porção, também, encontra-se a cromatina condensada, a qual é composta de ácido desoxirribonucleico (DNA) (GARNER; HAFEZ, 1995). A condensação da cromatina decorre da substituição das histonas por protamina (HUD et al., 1993), sendo importante para que o material genético permaneça minimamente exposto à ação de radicais livres (AGARWAL et

al., 2014) formados espontaneamente durante o metabolismo espermático (AGARWAL et al., 2014).

A cauda é subdividida em colo, peça intermediária, peça principal e peça terminal (GARNER; HAFEZ, 1995), sendo que sua função principal é de propulsionar o espermatozoide até o sítio de fertilização. Constitui-se basicamente de pares de microtúbulos condensados e fibras, cujo deslizamento promove o batimento flagelar, a partir de ondas de propulsão, os quais direcionam-se no sentido da peça intermediária para a porção final da cauda em movimento helicoidal (DON, 1975).

A energia necessária para o metabolismo espermático é quase que totalmente fornecida pelas mitocôndrias presentes na peça intermediária, pelas principais vias metabólicas da glicólise, ciclo do ácido cítrico, cadeia de transporte de elétrons, complexo piruvato desidrogenase e fosforilação oxidativa (KOTHARI et al., 2010). Tais vias de geração de energia são responsáveis pela disponibilização das moléculas de adenosina trifosfato (ATP) necessárias para a motilidade espermática (NELSON; COX, 2014). No entanto, a produção de energia, mesmo que em menores proporções, pode ser proveniente também de enzimas glicolíticas presentes nas fibras externas densas da cauda do espermatozoide (FERRAMOSCA; ZARA, 2014).

A membrana plasmática reveste o espermatozoide como um todo e é responsável pela seletividade na passagem de moléculas entre o meio externo e o citosol (DON, 1975). É composta por uma bicamada de fosfolipídios em meio a ligações não covalentes com colesterol e proteínas, sendo que tais proteínas são responsáveis pelo transporte de substâncias, ação enzimática e identificação celular (NICOLSON, 2014). Constituindo os fosfolipídios, os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), derivados dos ácidos linolêicos e linolênicos (NICOLSON, 2014), conferem fluidez à membrana, auxiliando na prevenção de danos às células espermáticas durante a refrigeração e criopreservação (DARNELL; LODISH; BALTIMORE, 1990).

Os AGPI estão também relacionados à vulnerabilidade dos espermatozoides ao ataque de radicais livres e à desestabilização da membrana (DE LAMIRANDE et al., 1997), uma vez que esses lipídios possuem dupla ligação adjacente a um grupo metileno, a qual enfraquece a ligação carbono-hidrogênio, formando um hidrogênio suscetível de ser captado pelas EROs (AGARWAL et al., 2014).

Embora sua composição lipídica seja diferente entre as espécies e indivíduos (SWAIN; MILLER JR, 2000; WATERHOUSE et al., 2006), os fosfolipídios (esfingomielina, fosfatidilcolina, glicolipídeos) e oligossacarídeos, de modo geral, distribuem-se na face

externa da membrana, enquanto que a fosfatidilserina, fosfatidilinositol e fosfatidiletanolamina estão distribuídas no citosol (DON, 1975).

Desta maneira, qualquer modificação na disposição de seus componentes resulta em alteração da função espermática (FOUQUET; KANN, 1994). No entanto, determinadas alterações fisiológicas na membrana podem caracterizar o processo de capacitação espermática, evento este essencial para a fertilização. As principais mudanças englobam a redução da carga elétrica dos espermatozoides, aumento da oxidação mitocondrial e efluxo do colesterol da membrana plasmática, seguido de alteração da relação colesterol/fosfolípidios (KOTHARI et al., 2010), ocorrendo, também, o redimensionamento da bicamada lipídica mediante translocação da fosfatidilserina, desestabilização da membrana e aumento de cálcio intracelular (DE LAMIRANDE et al., 1997).

Além disso, quando a capacitação não é regulada por fatores intrínsecos do espermatozóide, agentes indutores de capacitação *in vitro* podem ser utilizados, tais como heparina (FUKUI et al., 1990), cálcio (WHITFIELD; PARKINSON, 1995) e crocin (SAPANIDOU et al., 2015).

## **2.2 Radicais livres, estresse oxidativo e antioxidantes no sêmen**

Os danos celulares causados pelos radicais livres têm sido reportados como precursores de inúmeras alterações na reprodução humana, uma vez que a interação entre estas moléculas e células germinativas pode resultar em desenvolvimento embrionário deficiente ou no desenvolvimento de doenças neonatais iatrogênicas (AITKEN et al., 2010). Na reprodução animal, os radicais livres exercem influência negativa sobre a viabilidade espermática, quando presentes nos procedimentos utilizados em biotecnologias da reprodução, como na criopreservação espermática (ORTEGA et al., 2009).

Os radicais livres são moléculas intermediárias que apresentam um ou mais elétrons desemparelhados em sua órbita atômica. Esses elétrons caracterizam a natureza reativa dos radicais livres, resultando em interações com organelas e estruturas celulares, tais como lipídios e aminoácidos (DE OLIVEIRA; SCHOFFEN, 2010). Sabidamente, são representados por espécies reativas de oxigênio (EROs), radical hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ), ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) e radical hidroperoxila ( $\text{HO}_2^\bullet$ ), pelas espécies reativas de nitrogênio (ERN), como o óxido nítrico (NO), bem como pelos não radicais (NR), como peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ácido hipocloroso (HClO) e ozônio ( $\text{O}_3$ ) (AITKEN; CURRY, 2011).

Nos espermatozoides, os radicais livres são importantes para que as principais atividades metabólicas se desenvolvam, entre elas, a motilidade e cinética, maturação e capacitação espermática, reação acrossomal, bem como na estabilização da membrana plasmática e mitocondrial (AITKEN, 2017; FORD, 2004). Fisiologicamente, as EROs são produtos resultantes dos sistemas celulares por meio da cadeia respiratória dependente da glicose e oxigênio, da cascata enzimática da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH), ligada na membrana plasmática e mitocondrial (HENKEL, 2011), e via da oxidação de aminoácidos aromáticos a partir de espermatozoides mortos e/ou imaturos, bem como de leucócitos presentes no sêmen, principalmente na espécie bovina (UPRETI et al., 1998).

O  $O_2^{\cdot -}$  é considerado um dos primeiros produtos produzido durante o metabolismo do espermatozoide, sendo as mitocôndrias importantes fontes de  $O_2^{\cdot -}$  (DE LAMIRANDE et al., 1997). A presença de carga negativa dificulta o trânsito entre membranas celulares, todavia, sob ação da enzima superóxido dismutase (SOD) o radical é convertido em  $H_2O_2$ , assim como pode ser convertido em  $OH^{\cdot}$  por outros sistemas catalisadores enzimáticos (AITKEN, 2017).

O  $H_2O_2$ , dependendo dos níveis de sua produção, pode influenciar as reações respiratórias e oxirredutivas na célula, uma vez que possui elevada habilidade de se transportar através da membrana celular, tornando-o potente causador de danos à membrana plasmática espermática (ARMSTRONG et al., 1999). O aumento de  $H_2O_2$  está associado à queda da motilidade progressiva e a baixos índices de fertilidade em sêmen equino (JOHANNISSON et al., 2014), bem como aos danos causados no DNA do espermatozoide bovino (GÜRLER et al., 2015). A demanda energética necessária para a realização das atividades de movimento, maturação e capacitação espermática é elevada, sendo importante a manutenção de altos níveis de ATP. Todavia, a produção elevada de  $H_2O_2$  tem sido relacionada com danos na mitocôndria durante o processo de congelamento de sêmen, diminuindo a conversão de ATP em energia a qual promove queda da motilidade do espermatozoide (DIAS et al., 2018).

O  $OH^{\cdot}$  é um potente iniciador da cascata de peroxidação lipídica da membrana, resultando em alteração da membrana plasmática, perda de sua fluidez e, conseqüente, alteração da função do espermatozoide (AGARWAL et al., 2014). O radical é formado, inicialmente, pela reação de Haber-Weiss (Figura 1B), na qual a associação do  $O_2^{\cdot -}$  e  $H_2O_2$ , catalisada pelo  $Fe^{2+}$  ou  $Cu^{2+}$ , resulta na formação do  $OH^{\cdot}$ , dentre outros componentes, ou pela

reação do  $O_2^-$  com óxido nítrico (NO) formando o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), o qual se decompõe em  $NO_2$  e  $OH^-$  (Figura 1C) (HALLIWELL, 1991). Além disso, a propagação da peroxidação lipídica de membrana também é mediada pelo  $OH^\cdot$  pela reação de Fenton (Figura 1A), durante a qual o  $H_2O_2$  é catalisado por um agente redutor, usualmente o  $Fe^{2+}$ , resultando na geração de mais radicais  $OH^\cdot$  (AITKEN; FISHER, 1994).

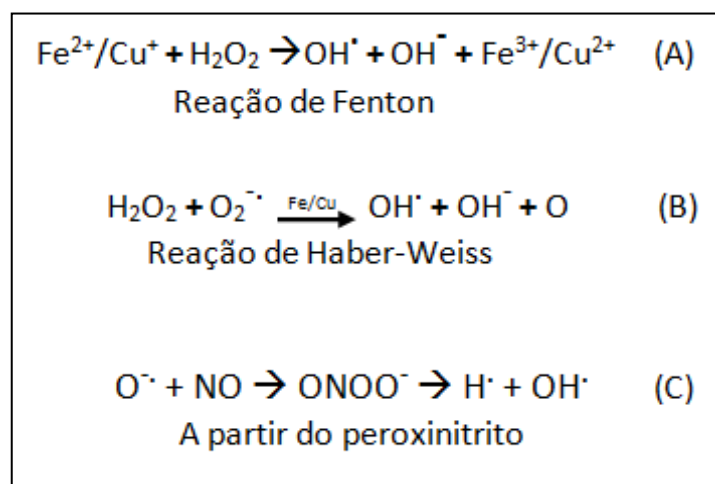


FIGURA 1. (A) Reação de Fenton. (B) Reação de Haber-Weiss. (C) Produção de  $OH^\cdot$  a partir do peroxinitrito. Fonte: autoria própria.

O processo de fertilização é acompanhado da hiperativação e capacitação do espermatozoide a partir de alterações estruturais que refletem no tipo de movimento espermático, por exemplo, no aumento de amplitude de deslocamento da cabeça, da velocidade e diminuição da motilidade progressiva dos espermatozoides (AITKEN; FISHER, 1994). De forma geral, essas mudanças estruturais e funcionais no espermatozoide são influenciadas principalmente pelo  $O_2^-$  e  $H_2O_2$  (DE LAMIRANDE et al., 1997) e são caracterizadas pela estimulação da atividade da adenilil ciclase (AITKEN et al., 1998), redução da carga elétrica do espermatozoide, aumento da oxidação mitocondrial, efluxo de colesterol da membrana plasmática (AITKEN; FISHER, 1994; O'FLAHERTY; DE LAMIRANDE; GAGNON, 2006), redimensionamento da bicamada lipídica, alterações dos padrões de componentes da membrana (DE LAMIRANDE; GAGNON, 1993) e acúmulo de cálcio intracelular (DE LAMIRANDE et al., 1997).

O estresse oxidativo pode ser instalado durante a atividade espermática, desde que ocorra um desequilíbrio na produção dos radicais livres, diminuição na capacidade reguladora do sistema antioxidante exógeno do espermatozoide, bem como falha no reparo dos danos

causados pelas reações oxidativas (AGARWAL et al., 2014). Os danos espermáticos gerados durante o estresse oxidativo podem resultar em redução da motilidade, danos à membrana plasmática e acrossomal, oxirredução de enzimas glicolíticas, bem como, peroxidação lipídica da membrana e desfragmentação de DNA (KOTHARI et al., 2010).

O aumento da produção das EROs e redução da quantidade e da funcionalidade de agentes antioxidantes encontrados no sêmen têm sido descritos durante a refrigeração e criopreservação espermática (BILODEAU et al., 2000). As enzimas supressoras de radicais livres tais como a glutathiona peroxidase (GSH), superóxido dismutase (SOD) e catalase, estão presentes no plasma seminal bovino, porém em baixas concentrações (GADEA et al., 2004), enquanto que no espermatozoide, encontram-se principalmente a SOD, GSH em baixa concentração e ausência da catalase (BILODEAU et al., 2000). A criopreservação do sêmen reduz os níveis de GSH nas espécies ovina (GADEA et al., 2004), bovina (BILODEAU et al., 2000) e humana (GADEA et al., 2004), da mesma forma que a SOD no bovino (BILODEAU et al., 2000). Similarmente, a criopreservação do sêmen de frangos é responsável pela redução da atividade da catalase em 14% no plasma seminal (PARTYKA; ŁUKASZEWICZ; NIZAŃSKI, 2012).

A vulnerabilidade do espermatozoide bovino aos processos oxidativos resulta da baixa disponibilidade de antioxidantes disponíveis no sêmen associada à composição da membrana plasmática, a qual é formada predominantemente por fosfolipídios ricos em ligações duplas adjacentes ao grupo metileno, resultando em ligações enfraquecidas entre carbono e hidrogênio (DE LAMIRANDE et al., 1997). Desta forma o hidrogênio torna-se suscetível à ação das EROs (AGARWAL et al., 2014).

Os agentes antioxidantes inibem as reações oxidativas ou reparam os danos causados pelos radicais livres, evitando a instalação do estresse oxidativo. Desta forma, possuem uma variedade de mecanismos de ação que compreendem desde a absorção da energia excedente do radical livre, doação de elétrons ao mesmo, sequestro de metais de transição, catalisadores da formação desses radicais, e indução de aumento do nível endógeno de outros componentes antioxidantes (HALLIWELL, 1991). A SOD possui ação catalisadora sobre o  $O_2^{\cdot-}$  reduzindo-o em oxigênio e  $H_2O_2$ , podendo agir tanto no citoplasma, como nas mitocôndrias. Além disso, tem sido relacionada com a prevenção da peroxidação lipídica de membrana e incremento da motilidade espermática (ZINI; AL-HATHAL, 2011). Adicionalmente, a enzima catalase é essencial para a redução do  $H_2O_2$  proveniente do metabolismo biológico, gerando componentes inofensivos à célula, como oxigênio e água (HALLIWELL, 1991). O GSH em

associação com as enzimas glutathione peroxidase (GPx) e glutathione reductase (GSH-Rd), auxilia na redução do  $H_2O_2$  e tem sido relacionado com a manutenção do batimento flagelar, redução da peroxidação lipídica da membrana, bem como com ação benéfica sobre a integridade da membrana plasmática espermática (GRIVEAU; LE LANNOU, 1994).

Os agentes antioxidantes, naturais ou sintéticos, possuem papéis significativos na proteção contra os radicais livres. Najafi et al. (2014) testaram o efeito da cisteamina e da ergotioneína, aminoácidos naturais sintetizados por alguns organismos vivos, adicionado ao sêmen descongelado de carneiro. Relataram ação benéfica de ambos os componentes, individualmente, na concentração de 6 mM, para a motilidade total e a integridade da membrana plasmática em relação ao controle. Além disso, os componentes reduziram a peroxidação lipídica da membrana plasmática pela redução do produto final da cascata de peroxidação, o malondialdeído. No entanto, a motilidade progressiva e outras características cinéticas e morfológicas não se modificaram com a referida suplementação.

Alguns autores relataram a ação antioxidante da trealose adicionada em diferentes concentrações (0, 25, 50, 100, e 200 mM) ao meio de refrigeração e congelamento (INRA-82) de sêmen equino. Após análises *in vitro*, as amostras de sêmen refrigeradas e as descongeladas, apresentaram maiores valores para motilidade e para a quantidade de células com integridade de membrana plasmática e acrossomal, além de acentuada proteção do DNA, quando comparadas com o controle. A avaliação *in vivo* resultou em maiores taxas de concepção após inseminação artificial (IA) com sêmen refrigerado suplementado com 50 mM de trealose em comparação com o sêmen congelado adicionado de trealose e ao controle (EL-BADRY; ABO EL-MAATY; EL SISY, 2017).

Tvrda et al. (2016) relataram a ação do licopeno como redutor (doador de elétron) do  $O_2^{\cdot-}$ , quando adicionado ao sêmen bovino fresco pré-diluído em solução salina. Para tanto, as amostras foram avaliadas em tempo de cultivo diferente as 0 a 4 horas e 24 a 36 horas após serem mantidas a temperatura ambiente (22 °C a 25 °C). As maiores concentrações do licopeno (1000 e 2000  $\mu M/L$ ) foram capazes de manter o movimento e a viabilidade espermática além de prevenir maior produção intracelular de  $O_2^{\cdot-}$ . Os autores relataram manutenção da atividade mitocondrial, diminuição da produção intracelular do  $O_2^{\cdot-}$  e aumento da motilidade total e progressiva. A adição do licopeno teve efeito benéfico nos grupos suplementados por manter a atividade do espermatozoide após procedimentos *in vitro* e por proteger contra os danos celulares referentes à interação com os radicais livres, em relação ao controle.

O resveratrol tem sido utilizado como agente antioxidante, principalmente em tratamento para aterosclerose (WILLCOX; ASH; CATIGNANI, 2004). Contudo, Garcez et al. (2010) fizeram uso do resveratrol adicionado, ao meio de congelamento de sêmen humano, considerados férteis ou inférteis, nas concentrações de 0,1, 1,0 e 10,0 mM. Demonstraram a capacidade do resveratrol na inibição dos danos causados aos lipídios da membrana plasmática, diminuição da peroxidação lipídica e aumento da atividade dos antioxidantes presentes no sêmen, como a catalase e a SOD. Entretanto, observaram diminuição da motilidade espermática, sugerindo que esse efeito deletério resultou da inibição da ciclo-oxigenase-1 (COX 1) pelo resveratrol (KENNEDY; KORN; THURSTON, 2003), uma vez que a COX1 está envolvida na produção de prostaglandinas relacionadas com a motilidade espermática (MENDONÇA et al., 2000).

Além do efeito do resveratrol sobre a COX 1 relatado por Kennedy et al. (2003), o mesmo foi relacionado à ação inibidora sobre as enzimas mitocondriais específicas para a produção de ATP. Desta forma, Tvrdá et al. (2016) relataram efeito tóxico do resveratrol adicionado nas concentrações de 100 e 200  $\mu\text{M/L}$  ao sêmen bovino fresco, diluído em solução salina, e mantido à temperatura ambiente por até um dia. Os autores descreveram queda acentuada da motilidade total e progressiva do espermatozoide, bem como inviabilidade da atividade mitocondrial, uma vez que possivelmente ocorreu privação das moléculas de ATP no sêmen. Todavia, a presença de 5, 10 ou 50  $\mu\text{M/L}$  de resveratrol ao meio diluidor resultou em estimulação da atividade dos espermatozoides e principalmente proteção contra possível dano oxidativo *in vitro*, diminuindo a geração de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ .

A adição de crocin no sêmen bovino após descongelamento e centrifugação, resultou em menor geração de EROs, como  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2^{\cdot-}$  e na diminuição da peroxidação lipídica da membrana plasmática, evidenciados pela queda do malanoaldeído nas aliquotas de sêmen incubados por até 240 minutos com 0,5 mM de crocin. Na cinética espermática, mesma concentração de crocin foi capaz de aumentar a motilidade total e a porcentagem de espermatozoides rápidos durante o tempo de incubação em comparação com o controle, entretanto, outras características de velocidade não foram beneficemente influenciadas (SAPANIDOU et al., 2015).

Em equinos, Rossi et al. (2016) analisaram os efeitos da adição de 1 mM da coenzima Q10 conjugada ou não com 1 mM de vitamina E ao sêmen fresco equino imediatamente após a colheita. Os autores não constatarem efeito benéfico sobre as características de velocidade do espermatozoide na presença dos antioxidantes após a refrigeração ou congelamento.

Entretanto, a utilização de quercetina (20 µg/mL) como suplemento no meio foi considerada efetiva para aumentar as taxas de concepção de sêmen congelado de garanhões classificados como sensíveis ao processo de congelamento (SILVA et al., 2018).

Em experimento conduzido por Sapanidou et al. (2014) foram avaliadas as características de velocidade espermática e de peroxidação lipídica da membrana de amostras de sêmen bovino descongeladas, centrifugadas e acrescidas de diferentes concentrações (1, 2 e 5 µg/ml) de extrato de uva, composto rico em polifenóis. Sugeriram uma relação entre o aumento do número de espermatozoides rápidos com a ação protetora do bagaço de uva (5 µg/ml) sobre a peroxidação lipídica, mesmo após duas horas de incubação da amostra a 37° C. Além disso, relataram aumento do potencial mitocondrial, diminuição da geração de EROs e principalmente menores índices de formação de malonoaldeído. Nenhum efeito protetor foi observado na adição do antioxidante sobre a VCL, VSL, ALH e VAP, entretanto, após quatro horas de incubação, os autores reportaram manutenção da peroxidação lipídica de membrana em comparação ao controle, mesmo com a queda dos valores de motilidade total e progressiva e início dos danos sobre a cromatina.

### **2.3 Bis-Carboxietil Sesquióxido Germânio**

O elemento químico germânio (Ge) é um dos semimetais da tabela periódica representado pelo número atômico 32, massa atômica de 72 u e configuração eletrônica  $3d^{10}4s^24p^2$ . O Ge foi descoberto por Clemens Alexander Winkler após análise final do mineral Argirodita, em 1886 (HALLER, 2006), sendo posteriormente considerado como um elemento biologicamente ativo, isolado em grande parte da superfície terrestre e de tecidos de organismos vivos (SCHROEDEDERM; BALUSA, 1967).

O Ge participa como micronutriente essencial do ginseng, shiitake, alho e cebola (SCHROEDEDERM; BALUSA, 1967), na composição de enzimas (citocromo oxidase e guaninas) e como elemento básico estrutural da parede celular, mitocôndria e cromossomos dos animais (SONG; JI; JING, 2005). Além disso, possui uma variedade de combinações químicas orgânicas e inorgânicas, sendo que o dióxido de germânio ( $GeO_2$ ), representativo da forma inorgânica, possui capacidade semicondutora de energia e ação citotóxica sobre organismos vivos (SCHROEDEDERM; BALUSA, 1967).

Entretanto, o derivado orgânico do germânio, o Bis(2-carboxyethylgermânio) sesquióxido ( $Ge_3O_8$ ) foi sintetizado a partir da hidrólise induzida por ácido ou éster do trihalogenopropiônico adicionado de trihalogenogermânio (GOODMAN, 1988), mostrou

aplicabilidade na indústria química e farmacêutica ao apresentar elevada atividade biológica e baixa toxicidade ao organismo (OH et al., 2010).

Resultados benéficos do Ge132, pertinentes à saúde humana e animal, têm sido relacionados com sua ação antibiótica (SIJPESTEIJIN et al., 1964), antiviral (ASO et al., 1989), antitumoral (SHANGGUAN et al., 2005), analgésica (HACHISU et al., 1983), anti-inflamatória (FURUSAWA et al., 1987) e preventiva da osteoporose (MATSUMOTO et al., 2002). Desordens imunológicas em pacientes humanos foram controladas na presença do Ge132 (PRÓNAI; ARIMORI, 1992), da mesma forma que, animais imunossuprimidos no pós-cirúrgico e suplementados com Ge132, exibiram maior atividade imunomoduladora dos macrófagos, evitando assim as complicações no pós-operatório (NAKADA et al., 1993). Injúrias dermatológicas induzidas em cobaias e em fibroblastos humanos testados *in vitro*, demonstraram efetivo poder reconstrutivo do Ge132 na cicatrização de lesões de pele (MATSUMOTO et al., 2016).

Dentre as inúmeras funções fisiológicas já descritas para o Ge132, destaca-se seu poder antioxidante, demonstrado, por exemplo, em tratamentos de hepatopatias causadas por compostos químicos em camundongos (YANG; KIM, 1999) e macacos (TEZUKA et al., 2017), ou decorrente de sua suplementação em dietas orais de ratos, proporcionando aumento da secreção e da ação antioxidante da bilirrubina (NAKAMURA et al., 2010). Além disso, Wakabashi (2001), após o tratamento de hipercolesterolemia em coelhos, suplementados com Ge132, relatou ação antioxidante do composto sobre lipoproteínas de baixa densidade (LDL). Essa ação foi resultante da doação de elétrons do Ge132 (GOODMAN, 1988) e da inibição da glicação dessas proteínas de baixa densidade (SHIMOJO et al., 1993), assim como, do efeito protetor sobre vitamina E, considerada ferramenta importante para a prevenção da oxirredução da LDL (ESTERBAUER et al., 1987).

Wada et al. (2018) pesquisaram o poder proliferativo, citotóxico e antioxidante do Ge132 sobre as células ovarianas de hamster, assim como nas células da linhagem neuronal humana (SH-SY5Y). Neste estudo, o Ge132 não apresentou efeito citotóxico sobre as células pesquisadas, todavia, sua adição promoveu taxas elevadas na proliferação celular, as quais foram representadas por 120% e 150% de aumento no número de células ovarianas e SH-SY5Y, respectivamente. Ainda nesse estudo, os autores observaram poder antioxidante do Ge132, caracterizado pelo acentuado declínio na produção de EROs, após indução de estresse oxidativo com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em ambos os cultivos celulares. Concluindo, tais investigadores sugeriram que o Ge132 pode ser um efetivo promotor do metabolismo celular, em humanos.

A combinação do Quercetin com o Germânio, originando o complexo Germânio-Quercetin (G-Q), foi utilizada no cultivo de células eritrocitárias humanas. O referido composto apresentou propriedades antioxidantes acentuadas contra o  $\text{OH}^{\cdot}$ , sem afetar as estruturas da membrana celular. Portanto, o complexo, G-Q protegeu os eritrócitos contra o estresse oxidativo ao inibir a desestabilização da membrana, tornando-a impermeável aos íons de cálcio (LI et al., 2012).

Quando adicionado (Ge132 100  $\mu\text{g/mL}$ ) em meio de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos suínos (KIM et al., 2015), o Ge132 não melhorou a maturação nuclear, não aumentando o número de oócitos em metáfase II, quando comparado ao grupo controle. Todavia, a adição de 200  $\mu\text{g/mL}$  de Ge132 na MIV, aumentou a produção de glutathiona (GSH) intracelular e diminuiu a geração de EROs, caracterizando uma efetiva maturação citoplasmática dos oócitos. Alta expressão de genes relacionados ao reparo de DNA, atividade antioxidante e controle apoptótico foi observada nos oócitos e nas células do cumulus no meio contendo 200  $\mu\text{g/mL}$  de Ge132.

Outra função relacionada à ação biológica do Ge132 foi relatada por Prónai e Arimori (1991), os quais, afirmaram que 50  $\mu\text{g/mL}$  de Ge132 pode estabilizar a membrana de leucócitos de humanos. Segundo Kim, et al. (2015) esta estabilização ocorre devido ao bloqueio dos canais iônicos livres a partir da imobilização induzida pelo Ge132 sobre as proteínas quinase C (PKC), fofolipases, fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH) oxidase.

Ao adicionar o Ge132 ao meio de cultivo *in vitro* de embriões suínos, Kim, et al. (2017) verificaram que o mesmo promoveu a ativação de mecanismos de defesa antioxidante dos próprios embriões, relacionada com o aumento da ativação do gene para o fator nuclear derivado de eritrócito 2 ( $\text{NRF}_2$ ), um indutor da produção de GSH, a qual é um potente agente antioxidante intracelular. Portanto, os autores concluíram que a adição de Ge132 limitou a produção de EROs nos embriões de 4 a 5 células, bem como reduziu a expressão de genes pró-apoptóticos e o desenvolvimento de embriões fragmentados.

Além do efeito benéfico do Ge132 sobre a expressão de genes anti-apoptóticos no meio de cultivo (KIM et al., 2017), outra teoria foi sugerida pelos autores para explicar a ação anti-apoptótica do componente, com base no seu poder quelante sobre as moléculas de ATP (NAKAMURA et al., 2015). A interação Ge132-ATP foi capaz de reduzir o efeito deletério do excesso de ATP no meio extracelular, durante o cultivo de embriões suínos. O mesmo

ocorreu na ausência de Ge132, quando alta concentração de ATP promoveu danos em células neuronais (STANCHEV et al., 2009; ZHENG et al., 1991).

O ácido ascórbico, conhecido como vitamina C, tem sido utilizado como potente agente antioxidante em muitos sistemas biológicos (MADHUMEET; AKSHAY, 2018), porém apresenta baixa lipossolubilidade e limitada disponibilização para a célula. Desta maneira, a ação dessa vitamina contra os radicais livres é progressivamente perdida (OH et al., 2010). Portanto, na tentativa de aumentar o efeito sinérgico contra as EROs geradas em vários sistemas metabólicos, o Ge132 devido ao seu caráter lipossolúvel (LUKEVICS; IGNATOVICH, 2002) foi testado em combinação com a vitamina C; tal conjugado mostrou-se funcionalmente estável e com potente efeito redutor de radicais livres, em cultivo de queratinócitos humanos (OH et al., 2010).

A atividade antioxidante do Ge132 está relacionada com o arranjo de seus elétrons externos ( $4s^2 4p^2$ ) e as pontes de ligação entre o Germânio e Oxigênio (Ge-O). Essas propriedades químicas facilitam a oxiredução dos radicais livres dentro do sistema em que operam, mediante doação de elétrons livres e captura de elétrons desemparelhados, caracterizando o Ge132 como um potente redutor de EROs (KIM et al., 2015, 2017).

Contudo, a ação antioxidante do Ge132 sobre os radicais livres tem sido questionada, quando se considera a ausência ou presença de água, desta forma Kim, et al. (2017) relataram que o efeito antioxidante do mesmo depende de água, em contraste com Vishtorskaya, et al. (2018), os quais observaram que na presença de água pode ocorrer redução ou até inibição do referido antioxidante.

A ligação entre o Germânio e metais de transição foi relacionada com sua influência sobre alguns elementos, por exemplo, o  $Fe^{2+}$  (WAKABAYASHI, 2001), dentro do metabolismo celular nas reações de Fenton e Haber-Weiss, as quais são responsáveis por uma das vias de produção do  $HO^{\cdot}$  (BUETTNER; JURKIEWICZ, 1996).

### 3.0 Referências

Referências organizadas de acordo com a Associação brasileira de normas técnicas – ABNT.

AGARWAL, A.; VIRK, G.; ONG, C.; DU PLESSIS, S. S. Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. **The World Journal of Men's Health**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 1, 2014.

Disponível em: <<https://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.5534/wjmh.2014.32.1.1>>

AITKEN, J.; FISHER, H. Reactive Oxygen Species Generation and Human Spermatozoa:

The Balance of Benefit and Risk. **BioEssays**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 259–267, 1994.

AITKEN, R.; CURRY, B. 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. **Antioxid Redox Signal.**, [s. l.], v. 14, n. 3, p. 367–81, 2011.

AITKEN, R. J. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. **Molecular Reproduction and Development**, [s. l.], v. 84, n. 10, p. 1039–1052, 2017.

AITKEN, R. J.; BAKER, M. A.; DE IULIIS, G. N.; NIXON, B. New insights into sperm physiology and pathology. In: **Handbook of Experimental Pharmacology**. [s.l: s.n.]. v. 198p. 99–115.

AITKEN, R. J.; HARKISS, D.; KNOX, W.; PATERSON, M.; IRVINE, D. S. A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterised by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation. **Journal of cell science**, [s. l.], v. 111, p. 645–656, 1998.

ALCAY, S.; BERK TOKER, M.; GOKCE, E.; USTUNER, B.; TEKIN ONDER, N.; SAGIRKAYA, H.; NUR, Z.; KEMAL SOYLU, M. Successful ram semen cryopreservation with lyophilized egg yolk-based extender. **Cryobiology**, [s. l.], v. 71, n. 2, p. 329–333, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.08.008>>

ARMSTRONG, J. S.; RAJASEKARAN, M.; CHAMULITRAT, W.; GATTI, P.; HELLSTROM, W. J.; SIKKA, S. C. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. **Free Radic.Biol.Med.**, [s. l.], v. 26, n. 7–8, p. 869–880, 1999.

ASO, H.; SUZUKI, F.; EBINA, T.; ISHIDA, N. Antiviral activity of carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132) in mice infected with influenza virus. **J Biol Response Mod.**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 180–189, 1989.

BILODEAU, J. F.; CHATTERJEE, S.; SIRARD, M. A.; GAGNON, C. Level of antioxidant defense are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, [s. l.], v. 55, n. 3, p. 282–8, 2000. Disponível em:

<<https://eurekamag.com/pdf/003/003489553.pdf>><https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

10657047>

BLOBEL, C. P.; WOLFSBERG, T. G.; TURCK, C. W.; MYLES, D. G.; PRIMAKOFF, P.; WHITE, J. M. A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm oocyte fusion. **Nature**, [s. l.], v. 356, p. 248–252, 1992.

BUETTNER, G. R.; JURKIEWICZ, B. A. Catalytic Metals, Ascorbate and Free Radicals: Combinations to Avoid. **Radiation Research**, [s. l.], v. 145, n. 5, p. 532–541, 1996.

Disponível em: <<https://www.jstor.org/stable/3579271?origin=crossref>>

DARNELL, J.; LODISH, H.; BALTIMORE, D. The plasma membrane. **Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 2, n. 13, p. 491–530, 1990.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. A positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation. **International Journal of Andrology**, [s. l.], v. 16, p. 21–25, 1993.

DE LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Journal of Reproduction and Fertility**, [s. l.], v. 2, p. 48–54, 1997. Disponível em:

<<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/1464727012000199321>>

DE OLIVEIRA, M. C.; SCHOFFEN, J. P. F. Oxidative stress action in cellular aging. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [s. l.], v. 53, n. 6, p. 1333–1342, 2010.

DIAS, E. A. R.; CAMPANHOLI, S. P.; ROSSI, G. F.; FREITAS DELL’AQUA, C. de P.; DELL’AQUA, J. A.; PAPA, F. O.; ZORZETTO, M. F.; DE PAZ, C. C. P.; OLIVEIRA, L. Z.; MERCADANTE, M. E. Z.; MONTEIRO, F. M. Evaluation of cooling and freezing systems of bovine semen. **Animal Reproduction Science**, [s. l.], v. 195, p. 102–111, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.05.012>>

DON, W. F. The Mammalian Spermatozoon. **development biology**, [s. l.], v. 44, p. 394–436, 1975.

EL-BADRY, D. A.; ABO EL-MAATY, A. M.; EL SISY, G. A. The Effect of Trehalose Supplementation of INRA-82 Extender on Quality and Fertility of Cooled and Frozen-Thawed Stallion Spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, [s. l.], v. 48, p. 86–92, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2016.08.020>>

ESTERBAUER, H.; JURGENS, G.; QUENENBERGER, O.; KOLLER, E. Autooxidation of human low density lipoprotein: loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes. **The Journal of Lipid Research**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 495–509, 1987.

FERRAMOSCA, A.; ZARA, V. Review Article: Bioenergetics of mammalian sperm capacitation. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2014, p. 1–8, 2014.

FORD, W. C. L. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. **Human Reproduction Update**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 387–399, 2004. Disponível em: <<https://academic.oup.com/humupd/article-lookup/doi/10.1093/humupd/dmh034>>

FOUQUET, J. P.; KANN, M. L. The cytoskeleton of mammalian spermatozoa. **Biology of the Cell**, [s. l.], v. 81, n. 2, p. 89–93, 1994.

FUKUI, Y.; SONOYAMA, T.; MOCHIZUKI, H.; ONO, H. Effects of heparin dosage and sperm capacitation time on in vitro fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in vitro. **Theriogenology**, [s. l.], v. 34, n. 3, p. 579–591, 1990.

FURUSAWA, S.; FUJIMURA, T.; HASHIMOTO, I.; KITAGAWA, Y.; SASAKI, K.; TAKAYANAGI, G. Effect of 2 carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132) on granuloma formation in rats. **Tohoku Yakka Daigaku Kenkyu Nempo**, [s. l.], v. 34, p. 263–268, 1987.

GADEA, J.; SELLÉS, E.; MARCO, M. A.; COY, P.; MATÁS, C.; ROMAR, R.; RUIZ, S. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. **Theriogenology**, [s. l.], v. 62, n. 3–4, p. 690–701, 2004.

GARCEZ, M. E.; DOS SANTOS BRANCO, C.; LARA, L. V.; PASQUALOTTO, F. F.; SALVADOR, M. Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human semen. **Fertility and Sterility**, [s. l.], v. 94, n. 6, p. 2118–2121, 2010.

GARNER, D. L.; HAFEZ, E. S. E. Espermatozóide e plasma seminal. In: **Reprodução Animal**. [s.l: s.n.]. p. 167–190.

GERBER, G. B.; LÉONARD, A. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of antimony compounds. [s. l.], v. 387, p. 141–146, 1997.

GOMEZ-ARRONES, V.; CARRASCO, J. J.; GAITSKELL-PHILLIPS, G.; PEÑA, F. J.;

FERRUSOLA, C. O. Effect of Sperm Concentration of the Frozen Ejaculate of Donkeys on Post-thaw Semen Quality. **Journal of Equine Veterinary Science**, [s. l.], v. 66, p. 60, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0737080618302375>>

GOODMAN, S. Therapeutic effects of organic germanium. **Medical hypotheses**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 207–215, 1988.

GRIVEAU, J. F.; LE LANNOU, D. Effects of antioxidants on human sperm preparation techniques. **International journal of andrology**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 225–231, 1994.

GÜRLER, H.; MALAMA, E.; HEPPELMANN, M.; CALISICI, O.; LEIDING, C.; KASTELIC, J. P.; BOLLWEIN, H. Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species, and DNA damage of bovine sperm. **Theriogenology**, [s. l.], v. 86, n. 2, p. 562–571, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.02.007>>

HACHISU, M.; TAKAHASHI, H.; KOEDA, T.; SEKIZAWA, Y. Analgesic effect of novel organogermanium compound, GE-132. **Journal of pharmacobio-dynamics**, [s. l.], v. 6, n. 11, p. 814–20, 1983. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6366183>>

HALLER, E. E. Germanium: From its discovery to SiGe devices. **Materials Science in Semiconductor Processing**, [s. l.], v. 9, n. 4–5 SPEC. ISS., p. 408–422, 2006.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. **The American Journal of Medicine**, [s. l.], v. 91, n. 3, p. 14–22, 1991.

HENKEL, R. R. Leukocytes and oxidative stress: Dilemma for sperm function and male fertility. **Asian Journal of Andrology**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 43–52, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/aja.2010.76>>

HUD, N. V.; ALLEN, M. J.; DOWNING, K. H.; LEE, J.; BALHORN, R. Identification of the elemental packing unit of DNA in mammalian sperm cells by atomic force microscopy. **Biochemical and Biophysical**, [s. l.], v. 193, p. 1347 – 1354, 1993.

JOHANNISSON, A.; LUNDGREN, A.; HUMBLLOT, P.; MORRELL, J. M. Naturally and stimulated levels of reactive oxygen species in cooled stallion semen destined for artificial insemination. **Animal**, [s. l.], v. 8, n. 10, p. 1706–1714, 2014.

KENNEDY, J. H.; KORN, N.; THURSTON, R. J. Prostaglandin levels in seminal plasma

and sperm extracts of the domestic turkey , and the effects of cyclooxygenase inhibitors on sperm mobility. **Reproductive Biology and Endocrinology**, [s. l.], v. 7, p. 1–7, 2003.

KIM, E.; HWANG, S.-U.; DAVID YOON, J.; JEUNG, E.-B.; LEE, E.; YOUNG KIM, D.; HYUN, S.-H. Carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132) treatment during in vitro culture protects fertilized porcine embryos against oxidative stress induced apoptosis. **Journal of Reproduction and Development**, [s. l.], v. 63, n. 6, p. 581–590, 2017.

Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5735269/pdf/jrd-63-581.pdf>>

KIM, E.; JEON, Y.; KIM, D. Y.; LEE, E.; HYUN, S. H. Antioxidative effect of carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132) on IVM of porcine oocytes and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and IVF. **Theriogenology**, [s. l.], v. 84, n. 2, p. 226–236, 2015. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.03.006>>

KOTHARI, S.; THOMPSON, A.; AGARWAL, A.; DU PLESSIS, S. S. Free radicals: Their beneficial and detrimental effects on sperm function. **Indian Journal of Experimental Biology**, [s. l.], v. 48, n. 5, p. 425–435, 2010.

LI, S. P.; XIE, W. L.; CAI, H. H.; CAI, J. Y.; YANG, P. H. Hydroxyl radical scavenging mechanism of human erythrocytes by quercetin-germanium (IV) complex. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 47, n. 1, p. 28–34, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2012.04.019>>

LUKEVICS, E.; IGNATOVICH, L. Chemistry of Organic Germanium, Tin and Lead Compounds. **J. Wiley and Sons**, [s. l.], v. 2, p. 1653–1683, 2002.

MACCHIA, G.; TOPO, E.; MANGANO, N.; D' ANIELLO, E.; BONI, R. dl-Aspartic acid administration improves semen quality in rabbit bucks. **Animal Reproduction Science**, [s. l.], v. 118, n. 2–4, p. 337–343, 2010.

MADHUMEET, S.; AKSHAY, S. Improvement in quality of frozen Jersey bull semen following fortification with chloroquine diphosphate and ascorbic acid Improvement in quality of frozen Jersey bull semen following fortification with chloroquine diphosphate and ascorbic acid. **Indian Journal of Animal Sciences**, [s. l.], v. 7, n. 88, p. 791–794, 2018.

MATA-CAMPUZANO, M.; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M.; ÁLVAREZ, M.; ANEL, L.; DE

PAZ, P.; GARDE, J. J.; MARTÍNEZ-PASTOR, F. Effect of Several Antioxidants on Thawed Ram Spermatozoa Submitted to 37°C up to Four Hours. **Reproduction in Domestic Animals**, [s. l.], v. 47, n. 6, p. 907–914, 2012.

MATSUMOTO, H.; IWAFUJI, H.; YAMANE, J.; TAKEUCHI, R.; UTSUNOMIYA, T.; FUJII, A. Restorative effect of organic germanium compound (Ge-132) on dermal injury. **Wound Medicine**, [s. l.], v. 15, p. 6–10, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.wndm.2016.09.001>>

MATSUMOTO, H.; JIANG, G. Z.; HASHIMOTO, T.; KUBOYAMA, N.; YAMANE, J.; NONAKA, K.; FUJII, A. Effect of organic germanium compound (Ge-132) on experimental osteoporosis in rats \_ the relationship between transverse strength and bone mineral density (BMD) or bone mineral content (BMC). **Int. J. Oral Med. Sci.**, [s. l.], v. 1, p. 10–16, 2002.

MENDONÇA, L. L. F.; KHAMASHTA, M. A.; NELSON-PIERCY, C.; HUNT, B. J.; HUGHES, G. R. V. Non-steroidal anti-inflammatory drugs as a possible cause for reversible infertility. **Rheumatology**, [s. l.], v. 39, n. 8, p. 880–882, 2000.

METZENDORF, C.; LIND, M. I. *Drosophila mitoferrin* is essential for male fertility: evidence for role of mitochondrial iron metabolism during spermatogenesis. **BMC Developmental Biology**, [s. l.], v. 10, n. 68, p. 68, 2010. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-213X/10/68>>

MORALES, C.; SYLVESTER, S. R.; GRISWOLD, M. D. Transport of iron and transferrin synthesis by the seminiferous epithelium of the rat in vivo. **Biology of reproduction**, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 995–1005, 1987. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3689862>>

NAJAFI, A.; KIA, H. D.; MOHAMMADI, H.; NAJAFI, M. H.; ZANGANEH, Z.; SHARAFI, M.; MARTINEZ-PASTOR, F.; ADEL DUST, H. Different concentrations of cysteamine and ergothioneine improve microscopic and oxidative parameters in ram semen frozen with a soybean lecithin extender. **Cryobiology**, [s. l.], v. 69, n. 1, p. 68–73, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.05.004>>

NAKADA, Y.; KOSAKA, T.; KUWABARA, M.; TANAKA, S.; SATO, K.; KOIDE, F. Effects of 2-carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132) as an immunological modifier of post-surgical immunosuppression in dogs. **J. Vet.Med.Sci.**, [s. l.], v. 55, p. 795–799, 1993.

NAKAMURA, T.; NAGURA, T.; AKIBA, M.; SATO, K.; TOKUJI, Y.; OHNISHI, M.; OSADA, K. Promotive Effects of the Dietary Organic Germanium Poly-trans-[(2-carboxyethyl) germasesquioxane] (Ge-132) on the Secretion and Antioxidative Activity of Bile in Rodents. **Journal of Health Science**, [s. l.], v. 56, n. 1, p. 72–80, 2010. Disponível em:

<[http://apps.webofknowledge.com/full\\_record.do?product=UA&search\\_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=R1EnxbgpiIBqcqUBhND&page=2&doc=15](http://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=UA&search_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=R1EnxbgpiIBqcqUBhND&page=2&doc=15)>

NAKAMURA, T.; SHIMADA, Y.; TAKEDA, T.; SATO, K.; AKIBA, M.; FUKAYA, H. Organogermanium compound, Ge-132, forms complexes with adrenaline, ATP and other physiological cis-diol compounds. **Future Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 7, n. 10, p. 1233–1246, 2015.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios da Bioenergética. In: **Lehninger Princípios da Bioquímica**. [s.l: s.n.]. p. 1298.

NICOLSON, G. L. The Fluid - Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, [s. l.], v. 1838, n. 6, p. 1451–1466, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.10.019>>

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 and Medicine**, [s. l.], v. 41, n. 4, p. 528–540, 2006.

OH, C.; LI, M.; KIM, E. H.; PARK, J. S.; LEE, J. C.; HAM, S. W. Antioxidant and radical scavenging activities of ascorbic acid derivatives conjugated with organogermanium. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, [s. l.], v. 31, n. 12, p. 3513–3514, 2010.

OMBELET, W.; VAN ROBAYS, J. Artificial insemination history: hurdles and milestones. **Facts, views & vision in ObGyn**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 137–43, 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4498171&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>

ORTEGA, F. C.; GONZÁLEZ, F. L.; MORRELL, J. M.; SALAZAR, S. C.; MACÍAS, G. B.; RODRÍGUEZ-MARTINEZ, H.; TAPIA, J. A.; PEÑA, F. J. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C 11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent

and is related to apoptotic-like changes. **Reproduction**, [s. l.], v. 138, n. 1, p. 55–63, 2009.

PARTYKA, A.; ŁUKASZEWICZ, E.; NIZAŃSKI, W. Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen.

**Theriogenology**, [s. l.], v. 77, n. 8, p. 1497–1504, 2012.

PRÓNAI, L.; ARIMORI, S. Protective effect of carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132) on superoxide generation by <sup>60</sup>Co-irradiated leukocytes. **Biotherapy**, [s. l.], v. 3, p. 273–279, 1991.

PRÓNAI, L.; ARIMORI, S. Decreased plasma superoxide scavenging activity in immunological disorders - carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132) as a promoter of prednisolone. **Biotherapy**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 1–8, 1992.

ROSSI, M.; FALOMO, M. E.; MANTOVANI, R. Role of coenzyme Q and vitamin E on stallion semen motility evaluated both in frozen and cooled-stored semen. **Italian Journal of Animal Science**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 595–603, 2016.

SAPANIDOU, V. G.; MARGARITIS, I.; SIAHOS, N.; ARSENOPOULOS, K.; DRAGATIDOU, E.; TAITZOGLU, I. A.; ZERVOS, I. A.; THEODORIDIS, A.; TSANTARLIOTOU, M. P. Antioxidant effect of a polyphenol-rich grape pomace extract on motility, viability and lipid peroxidation of thawed bovine spermatozoa. **Journal of Biological Research (Greece)**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 1–6, 2014.

SAPANIDOU, V.; TAITZOGLU, I.; TSAKMAKIDIS, I.; KOURTZELIS, I.; FLETOURIS, D.; THEODORIDIS, A.; ZERVOS, I.; TSANTARLIOTOU, M. Antioxidant effect of crocin on bovine sperm quality and in vitro fertilization. **Theriogenology**, [s. l.], v. 84, n. 8, p. 1273–1282, 2015. Disponível em:  
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.07.005>>

SCHROEDEDERM, H. A.; BALUSA, J. J. Abnormal Metals in Man : GERMANIUM. **J. chron. Dis**, [s. l.], v. 20, p. 211–224, 1967.

SHANGGUAN, G.; XING, F.; QU, X.; MAO, J.; ZHAO, D.; ZHAO, X.; REN, J. DNA binding specificity and cytotoxicity of novel antitumor agent Ge132 derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. 2962–2965, 2005.

SHIMOJO, N.; PAN, J. .; YOSHIOKA, K.; ISHII, T.; NAKAJIMA, C.; NAKA, K.;

OKUDA, K. Effects of organic germanium compounds on glycated plasma proteins in diabetic rat. **Clinical Chemistry and Enzymology Communications**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 179–184, 1993.

SIEME, H.; OLDENHOF, H.; WOLKERS, W. F. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. **Animal Reproduction Science**, [s. l.], v. 169, p. 2–5, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.004>>

SIJPESTEIJN, A. K.; RIJKENS, F.; VAN DER KERK, G. J.; MANTEN, A. Antimicrobial Activity of Organogermanium Derivatives. **Nature**, [s. l.], v. 201, n. 736, p. 1964, 1964.

SILVA, L. F. M. C.; ARAUJO, E. A. B.; OLIVEIRA, S. N.; DALANEZI, F. M.; JUNIOR, L. A.; CARNEIRO, J. A. M.; RODRIGUES, L. T.; HAYASHI, R. M.; CRESPILO, A. M.; DELL'AQUA, C. P. F.; DELL'AQUA JUNIOR, J. A.; PAPA, F. O. Quercetin Promotes Increase in the Fertility Rate of Frozen Semen of Stallions Considered Sensitive to Freezing. **Journal of Equine Veterinary Science**, [s. l.], v. 66, n. 2014, p. 82, 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0737080618302533>>

SONG, C. L.; JI, C.; JING, X. D. Advance in Physical and Chemical Properties of Germanium and Nutrition Functions in Animals. **Chinese Journal of Animal Science**, [s. l.], v. 41, p. 64–66, 2005.

STANCHEV, D.; BLOSA, M.; MILIUS, D.; GEREVICH, Z.; RUBINI, P.; SCHMALZING, G.; ESCHRICH, K.; SCHAEFER, M.; WIRKNER, K.; ILLES, P. Cross-inhibition between native and recombinant TRPV1 and P2X3 receptors. **Pain**, [s. l.], v. 143, n. 1–2, p. 26–36, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pain.2009.01.006>>

SWAIN, J. E.; MILLER JR, R. R. A postcryogenic comparison of membrane fatty acids of elephant spermatozoa. **Zoo Biol**, [s. l.], v. 19, p. 461–73, 2000.

TEZUKA, T.; HIGASHINO, A.; AKIBA, M.; NAKAMURA, T. Organogermanium (Ge-132) Suppresses Activities of Stress Enzymes Responsible for Active Oxygen Species in Monkey Liver Preparation. **Advances in Enzyme Research**, [s. l.], v. 05, n. 02, p. 13–23, 2017. Disponível em: <<http://www.scirp.org/journal/doi.aspx?DOI=10.4236/aer.2017.52002>>

TVRDÁ, E.; LUKÁČ, N.; JAMBOR, T.; LUKÁČOVÁ, J.; HASHIM, F.; MASSÁNYI, P. In vitro supplementation of lycopene to bovine spermatozoa: Effects on motility, viability and

superoxide production. **Animal Science Papers and Reports**, [s. l.], v. 34, n. 4, p. 319–328, 2016.

UNDERWOOD, S. L.; BATHGATE, R.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G. Birth of offspring after artificial insemination of heifers with frozen-thawed, sex-sorted, re-frozen-thawed bull sperm. **Animal Reproduction Science**, [s. l.], v. 118, n. 2–4, p. 171–175, 2010.

UPRETI, G. C.; JENSEN, K.; MUNDAY, R.; DUGANZICH, D. M.; VISHWANATH, R.; SMITH, J. F. Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: Role of pyruvate as an antioxidant. **Animal Reproduction Science**, [s. l.], v. 51, n. 4, p. 275–287, 1998.

VISHTORSKAYA, A. A.; SAVERINA, E. A.; PECHENNIKOV, V. M.; KRYLOVA, I. V.; LALOV, A. V.; SYROESHKIN, M. A.; EGOROV, M. P.; JOUIKOV, V. V. Assessing Ge-132 as an antioxidant in organic and water-containing media. **Journal of Organometallic Chemistry**, [s. l.], v. 858, p. 8–13, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2018.01.004>>

WADA, T.; HANYU, T.; NOZAKI, K.; KATAOKA, K.; KAWATANI, T.; ASAHI, T.; SAWAMURA, N. Antioxidant activity of Ge-132, a synthetic organic germanium, on cultured mammalian cells. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, [s. l.], 2018. Disponível em: <[https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/advpub/0/advpub\\_b17-00949/\\_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/advpub/0/advpub_b17-00949/_article)>

WAKABAYASHI, Y. **Effect of germanium-132 on low-density lipoprotein oxidation and atherosclerosis in Kurosawa and Kusanagi hypercholesterolemic rabbits.**, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11577738>>

WATERHOUSE, K. E.; HOFMO, P. O.; TVERDAL, A.; MILLER JR, R. R. Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. **Reproduction**, [s. l.], v. 131, p. 887–94, 2006.

WESTERN, P. S.; MILES, D. C.; VAN DEN BERGEN, J. A.; BURTON, M.; SINCLAIR, A. H. Dynamic Regulation of Mitotic Arrest in Fetal Male Germ Cells. **Stem Cells**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 339–347, 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1634/stemcells.2007-0622>>

WHITFIELD, C. H.; PARKINSON, T. J. Assessment of the fertilizing potential of frozen bovine spermatozoa by in vitro induction of acrosome reactions with calcium ionophore

(A23187). **Theriogenology**, [s. l.], v. 44, n. 3, p. 413–422, 1995.

WILLCOX, J. K.; ASH, S. L.; CATIGNANI, G. L. Antioxidants and prevention of chronic disease. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 44, n. 4, p. 275–295, 2004.

YANG, M. K.; KIM, Y. G. Protective role of germanium-132 against paraquat-induced oxidative stress in the livers of senescence-accelerated mice. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A**, [s. l.], v. 58, n. 5, p. 289–297, 1999.

ZHENG, L. M.; ZYCHLINSKY, A.; LIU, C.-C.; OJCIUS, D. M.; DING, J.; YOUNG, -E. Extracellular ATP as a Trigger for Apoptosis or Programmed Cell Death. **Journal of Cell Biology**, [s. l.], v. 112, n. 2, p. 279–288, 1991.

ZINI, A.; AL-HATHAL, N. Antioxidant therapy in male infertility: Fact or fiction? **Asian Journal of Andrology**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 374–381, 2011.

# *Capítulo 2*

*“Ter Fé não significa estar livre de momentos difíceis, mas sim ter a força para enfrentá-los sabendo que não estamos sozinhos.”*

*Papa Francisco*

**ARTIGO: Efeitos do Bis-carboxietil sesquióxido germânio (Ge132) adicionado ao meio de criopreservação de sêmen bovino sobre as características espermáticas morfofuncionais**

Artigo redigido segundo as normas da revista *Theriogenology*, exceto para a disponibilização das figuras e tabelas as quais foram distribuídas em meio ao corpo do texto. <https://www.journals.elsevier.com/theriogenology> ranqueada qualis A2

Tairini E. Cruz<sup>a\*</sup>, Alicio Martins Jr.<sup>b</sup>, Fernanda N. Marqui<sup>a</sup>, Diego G. Souza<sup>c</sup>, Tatiana I. U. Berton<sup>d</sup>, Camila P.F. Dell'Aqua<sup>a</sup> e Eunice Oba<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu. Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária. Rua Prof. Doutor Walter Mauricio Correa, s/n, 18618-681, SP, Brasil.  
tairini.cruz@gmail.com; fernanda\_nunes\_37@hotmail.com; camila.freitas-dellaqua@unesp.br; eunice.oba@unesp.br

<sup>b</sup> Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Medicina Veterinária, Araçatuba. Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal. Rua Clóvis Pestana, 793, 16050-680, SP, Brasil. alicio.martins-junior@unesp.br

<sup>c</sup> MasterFertility Reprodução Animal Ltda., Rua Cristiano Olsen, 1357, Sala 02, 16015-515, Araçatuba, SP, Brasil. contato@masterfertility.com.br

<sup>d</sup> Tairana Central de Inseminação Artificial, Rod. Raposo Tavares, KM 563, 19023-310, Presidente Prudente, SP, Brasil. tatiana@tairana.com.br

\*Autor correspondente: tairini.cruz@gmail.com. Telefone: (011) 98266-2602.

## RESUMO

Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos de diferentes concentrações de Bis-carboxietil sesquióxido germânio (Ge132), adicionado ao meio de congelamento de sêmen bovino, mantido ou não sob prévia incubação, sobre as características espermáticas avaliadas, pós-descongelamento. Nove ejaculados de três touros foram misturados e divididos em grupo D (sêmen diluído e incubado a 33 °C por 30 minutos antes da refrigeração) e R (sêmen refrigerado a 4 °C imediatamente após a diluição). Ambos o grupos foram suplementados com 0, 500 e 1000 µg/mL de Ge132, resultando nos subgrupos experimentais D0, R0, D500, D1000, R500 e R1000. Após congelamento, as amostras de sêmen foram descongeladas e avaliadas aos 5 e 60 minutos, quanto a motilidade, velocidade e alterações morfofuncionais espermáticas. Os dados foram analisados, considerando-se a diferença entre os grupos e entre os momentos de avaliação. Maior valor para motilidade total ( $P<0,05$ ) foi obtido no R0 em comparação com o R1000, D500 e D0. As análises realizadas aos 5 e 60 minutos revelaram diminuição dos valores da motilidade total no R500 e no R1000 e no D0, D500 e R500 para a ALH. Além disso, os valores da LIN aumentaram ( $P<0,05$ ) no D1000, da mesma forma que a diferença para a STR entre os momentos foi maior no R500, R1000 e D1000. Maior porcentagem ( $P<0,05$ ) de células com integridade de membrana foi observada no R500 do que no D0, D1000 e R1000, assim como para células sem desestabilização de membrana, a qual R500 apresentou maior porcentagem do que D1000. Menor geração de  $O_2^{\cdot-}$  ocorreu no R0, sendo que nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos para  $H_2O_2$  e potencial de membrana mitocondrial. Após indução de estresse oxidativo com ácido aracdônico, maior ( $P<0,05$ ) intensidade de fluorescência para a peroxidação lipídica foi observada nos subgrupos com o ácido, porém, dentro de cada grupo, menor peroxidação foi observada no D1000 do que no R0 na ausência ou presença do ácido. De modo geral, nenhum efeito antioxidante marcante foi observado após a adição de Ge132 ao meio de congelamento de sêmen. Entretanto, algumas características de velocidade foram incrementadas, assim como, certa proteção à membrana espermática foi pronunciada, permitindo a diminuição da peroxidação lipídica de membrana.

**Palavras-chave:** antioxidante, espécie reativa de oxigênio, meio diluente, qualidade espermática.

## ABSTRACT

This study aimed to investigate the effects of different concentrations of Bis-carboxyethyl sesquioxide germanium (Ge132) added to a bovine freezing medium, maintained or not under previous incubation, on frozen/thawed sperm characters. Nine bull ejaculates were pooled and divided into group D (ejaculate was diluted and kept at 33 °C for 30 min before cooling) and R (ejaculate was diluted and immediately cooled at 4 °C). Both of groups were added with 0, 500, and 1000 µg/mL of Ge132, forming the experimental groups D0, R0, D500, D1000, R500, and R1000. After freezing, the sperm samples were thawed and assessed at 5 and 60 minutes for motility, velocity and morphological/functional characteristics. The data were expressed taking into account a difference between the groups and between the moments of analysis. Higher ( $P<0.05$ ) mean values were obtained in R0 for total motility in comparison to R1000, D500, and D0. The analyzes at 5 and 60 minutes revealed a significant decreased for total motility in R500 and R1000, as well as, in D0, D500 and R500 for ALH. However, mean values for LIN increased ( $P<0.05$ ) in D1000, similarly that the difference for STR between moments was higher in R500, R1000 and D1000. Greater proportions ( $P<0.05$ ) for acrossomal and plasmatic membrane integrity were observed in R500 than in D0, D1000 and R1000, as well as for without membrane destabilization than in D1000. Lower production of  $O_2^{\cdot-}$  occurred in R0, with no significant differences among groups for  $H_2O_2$  and mitochondrial membrane potential. After oxidative induction test with aradonic acid, higher ( $P<0.05$ ) fluorescence intensity was found for lipid membrane peroxidation in subgroups with acid. Regarding to the values within groups, lower results was measured for peroxidation in D1000 compared to R0, either in the presence or absence of acid. On overall, no remarkable antioxidant effect was observed after Ge132 addition to the semen freezing extender. However, as some sperm velocity characteristics were improved, as well as a such protection to the sperm membrane was pronounced, allowing the reduction of membrane lipid peroxidation.

**Keywords:** antioxidant, extender, reactive oxygen species, sperm quality.

## 1. INTRODUÇÃO

A criopreservação de sêmen bovino é de grande importância, uma vez que permite rápido melhoramento genético do rebanho em larga escala e difusão de outras biotécnicas aplicadas em reprodução animal. Todavia, cerca de metade da população espermática não tolera bem o congelamento [1] devido à exposição dos espermatozoides ao desequilíbrio osmótico, à abrupta queda da temperatura [2] e à elevada produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) [3].

Os espermatozoides produzem EROs durante seu metabolismo [4], porém, muitas vezes, são incapazes de combatê-las quando em altas concentrações, e de reparar os danos oxidativos causados, devido à baixa disponibilidade de componentes antioxidantes no seu citoplasma [5]. Desta forma, a suplementação de meios de refrigeração e/ou de congelamento de sêmen com diferentes antioxidantes, tais como: lycopene [6] e crocin [7] tem sido utilizada visando conferir maior viabilidade aos espermatozoides no pós-descongelamento.

O bis-carboxietil sesquióxido germânio (Ge132) foi descrito como potente agente antioxidante e utilizado no tratamento de hepatopatias causadas por compostos químicos em camundongos [8] e macacos [9]. Efeitos desejáveis sobre a proliferação de células ovarianas [10], bem como atividade anti-inflamatória [11], antitumoral [12], antiviral [13], antimicrobiana [13] e imunoestimulante [14] também foram descritos. Além disso, foram reportadas ações importantes do Ge132 na estabilização da membrana de eritrócitos [15] e leucócitos [16] humanos em cultivo *in vitro*, e na inibição da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), no tratamento de hipercolesterolemia, em coelhos [17].

Ao Ge132 tem sido creditado, ainda, importante ação antioxidante e anti-apoptótica em meios de cultivo de oócitos [18] e de embriões suínos [19]. Tal efeito resultou da ação do Ge132 sobre a ativação de genes específicos envolvidos nos mecanismos de defesa anti-apoptótica em embriões, aumentando a produção de antioxidantes intracelulares, como a glutatona e, assim, conferindo maior proteção ao embrião durante o cultivo *in vitro* [19].

A ação antioxidante do Ge132 decorre do arranjo de seus elétrons externos e das pontes de ligação entre o germânio e o oxigênio (Ge-O) [15], que permitem que elétrons desemparelhados sejam facilmente capturados pelo Ge, tornando-o um eficiente varredor de radicais livres [10]. Por atuar como agente quelante de metais de transição [17], o Ge132 interfere na atividade do ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) dentro do metabolismo celular,

especificamente, nas reações Haber-Weiss e Fanton, regulando a produção do radical  $\text{OH}^\cdot$  [20,21], prevenindo a ocorrência de danos causados pela peroxidação lipídica da membrana plasmática [22,23]. Por conseguinte, com a versatilidade do Ge132, admite-se que sua adição em meio de criopreservação de sêmen bovino poderia manter ou até mesmo aumentar os valores referentes aos parâmetros de cinética espermática, bem como, proteger as características morfofuncionais no pós-descongelamento.

Todavia, não foram encontrados na literatura, em nenhuma espécie, relatos da utilização de Ge132 como agente antioxidante para as células espermáticas, exceto para uma única citação sobre seu efeito protetor sobre a morfologia da cabeça do espermatozoide [24]. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos de diferentes concentrações de Ge132, adicionado ao meio de congelamento de sêmen bovino, mantido ou não sob prévia incubação, sobre as características de cinética e integridade morfofuncional das membranas espermáticas, bem como produção de espécies reativas de oxigênio.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

Este estudo foi conduzido, de acordo com as diretrizes éticas ditadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP – Botucatu, SP, Brasil, com protocolo de número 0150/2018.

### **2.1. Animais e colheita de sêmen**

Três touros da raça Nelore, dos quais dois animais com 6 e outro com 5 anos de idade e escore corporal de  $997 \pm 58$  kg foram utilizados no experimento. Os animais, lotados na Central Tairana de Inseminação Artificial ( $22^\circ 09' 51,0''\text{S}$   $51^\circ 22' 33,1''\text{W}$ ), localizada em Presidente Prudente, SP, Brasil, foram mantidos sob condições similares de manejo geral e nutricional (feno de Coast Cross e ração com 12% de proteína). Três ejaculados de cada animal foram colhidos, por meio de vagina artificial, em três diferentes ocasiões, durante o mês de abril de 2018, característico de clima tropical com inverno seco [25]. As amostras de sêmen foram colhidas de tal forma que o intervalo entre as mesmas não ultrapassou 10 minutos e com a ordem dos saltos intercalada entre as três rotinas. Então, os ejaculados dos três animais foram misturados para constituir um pool das amostras, visando minimizar o efeito touro.

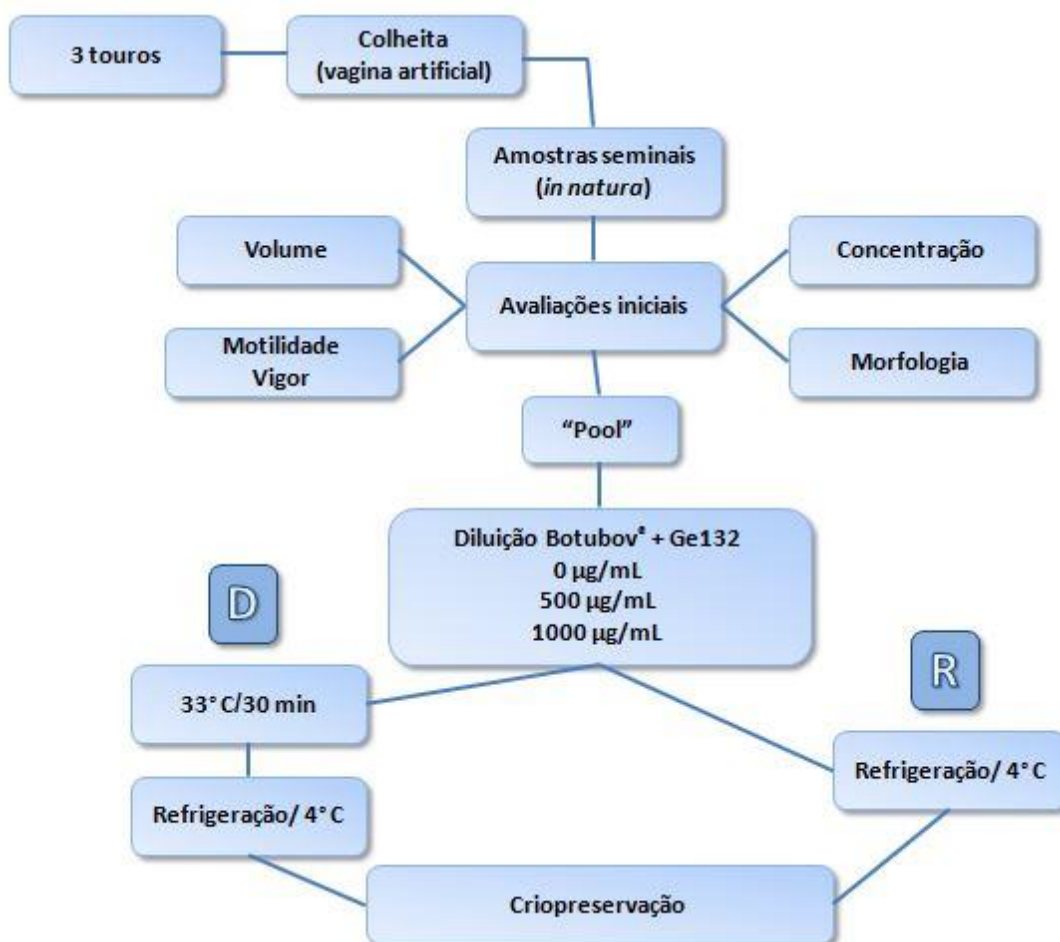
## 2.2. Análise espermática pré-congelamento

Após a colheita, o sêmen foi avaliado quanto a motilidade (%), vigor (escala de 0 a 5), concentração (número de espermatozoides/mL) e morfologia espermática, considerando-se os defeitos maiores (%) e menores (%). Os ejaculados foram mantidos a temperatura ambiente (25° C) até que todas as amostras fossem avaliadas. Uma amostra do sêmen foi diluída em solução de citrato de sódio a 2,94% e colocada entre lâmina e lamínula para avaliação da motilidade e vigor em microscópio de contraste de fase (Microscópio binocular Axiostar Plus, Carl Zeiss<sup>®</sup>, Alemanha). A concentração espermática foi verificada por meio de espectrofotômetro (ACCUCCELL phometer, IMV Technologies, França) e a morfologia utilizando microscopia de contraste de fase, após diluição em solução de citrato de sódio com formol. As amostras colhidas e utilizadas no estudo seguiram critério estabelecido pelo colégio Brasileiro de Reprodução Animal [26] com motilidade progressiva  $\geq 60\%$ , vigor  $\geq 3$ , concentração espermática  $\geq 700 \times 10^6/\text{mL}$  e defeitos totais  $\leq 30\%$ , defeitos maiores  $\leq 10\%$  e defeitos menores  $\leq 20\%$ .

## 2.3. Preparo do sêmen pré-congelamento

O meio de congelamento de sêmen BotuBov<sup>®</sup> (Botupharma, Botucatu, São Paulo, Brasil) foi utilizado para a diluição do “pool”, sendo ajustada uma concentração espermática final de  $30 \times 10^6$  espermatozoides por palheta de 0,25 mL (IMV, França) para todos os grupos. O meio foi homogeneizado em agitador magnético (Fanem, São Paulo, Brasil), por 30 minutos, imediatamente após a suplementação com Ge132 (396265, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) nas concentrações de 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ou 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . As diferentes concentrações de Ge132 testadas neste estudo basearam-se em estudos reportados na literatura (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) tanto na maturação *in vitro* de oócitos de suíno [18] como no seu cultivo embrionário [19].

No entanto, na presente investigação, por se tratar da sua adição em meio de congelamento de sêmen, ou seja, contendo glicerol, gema, entre outros componentes, optou-se pela utilização de concentrações mais elevadas do Ge132. Posteriormente, os grupos com 0, 500 e 1000 de Ge132 foram redivididos em dois subgrupos, um incubado a 33 °C por 30 minutos (D) e outro submetido à imediata refrigeração a 4 °C (R) (Figura1).



**Figura 1.** Arranjo esquemático das etapas de preparo das amostras seminais no pré-congelamento

As etapas de refrigeração e congelamento foram similares para todos os subgrupos. Assim, as amostras de sêmen foram refrigeradas em tubos de 50 mL (Corning, New York, USA) e então, acondicionadas dentro de canecas plásticas (IMV, França) com água, mantidas em câmara fria a 4 °C, por 90 minutos, antes do envase.

Decorridas 5 horas de refrigeração, as palhetas foram colocadas em congelador programável (Digitcool, IMV, França) e congeladas, segundo a curva padrão de 4 °C a -10 °C (5 °C/min), de -10 °C a -100 °C (40 °C/min) e de -100 °C a -140 °C, a 20 °C/min, num total de 8 minutos. Na sequência, as mesmas foram mergulhadas em nitrogênio líquido, raqueadas e armazenadas em botijão isotérmico até o momento das análises.

#### 2.4. Análise computadorizada da motilidade e cinética espermática

A análise computadorizada do sêmen foi feita no laboratório da MasterFertility Ltda, em Araçatuba, SP. As amostras de sêmen (duas palhetas/rotina/grupo) foram descongeladas em água a 37 °C por 20 segundos e mantidas a 38 °C até o momento da análise aos 5 (M5) e 60 (M60) minutos do pós-descongelamento. Para tanto, foi utilizado um microscópio com contraste de fase negativo (E200-LED, Nikon, Japão), acoplado a uma câmera de vídeo (Basler Vision Technologies, Ahrensburg, Alemanha). Os dados gerados foram analisados por meio do *software* MMC Sperm, versão 2.3 (São Petersburgo, Rússia).

O equipamento foi configurado como se segue: número de quadros = 60 FPS, área mínima = 10 µm, área máxima = 65 µm, células progressivas = STR > 65%, células móveis = VSL > 10 µm/s e número de campos/espermatozoides contados = 5 campos/mínimo de 1.000 espermatozoides no total. As seguintes características espermáticas foram avaliadas: motilidade total (MT; %), motilidade progressiva (MP; %), velocidade curvilínea (VCL; µm/s), velocidade progressiva (VSL; µm/s), velocidade média de trajeto (VAP; µm/s), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH; µm), batimento flagelar (BCF; Hz), linearidade (LIN; %), retilinearidade (STR; %).

#### 2.5. Análise morfofuncional do espermatozoide em citômetro de fluxo

Um citômetro de fluxo BD LSR Fortessa (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA), equipado com laser de cor violeta (405 nm, 100 mW), azul (488 nm, 100 mW) e vermelho (640 nm, 40 mW) foi utilizado para as análises. Para as mensurações de fluorescência foram empregados filtros de 450/50 nm (H342), 530/30 nm (FITC) e 694/50 nm (PI). Após as leituras, considerando-se 10.000 células analisadas, os dados foram analisados em software compatível (BD FACSDiva™, software v6.1, Becton Dickinson) e os dados gerados foram disponibilizados na forma de “dot plot”, incluindo eixo.

As amostras foram diluídas na concentração de  $5 \times 10^6$  espermatozoides/mL, em meio TALP-PVA, segundo Parrish et al. (1988) [27], consistindo de 100 mM de NaCl, 3,1 mM de KCl, 25,0 mM de  $\text{NaHCO}_3$ , 0,3 mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 21,6 mM DL-lactato de sódio 60%, 2,0 mM  $\text{CaCl}_2$ , 0,4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10,0 mM Hepes-livre de ácido, 1,0 mM de piruvato de sódio, 1,0 mg/mL de álcool polivinílico e 25  $\mu\text{g/mL}$  de sulfato de gentamicina. Para eliminação de debris celulares e partículas de aquisição, 7  $\mu\text{M}$  de Hoechst 3342 (H3342; 14533, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) foi acrescentado ao referido meio.

Para a avaliação de membrana plasmática e acrossomal integras (MPAI) foi utilizada uma associação das sondas de iodeto de propídio (IP; P-4170, Sigma-Aldrich, MO, USA) e FITC-PSA (PSA; L-0770, Sigma-Aldrich, MO, USA), segundo Freitas-Dell'Aqua et al. [28]. Assim, as amostras de sêmen (200  $\mu\text{L}$ ) foram diluídas e acrescidas de 1,5  $\mu\text{M}$  de IP e 2 ng de FITC-PSA e, então, homogeneizadas e incubadas a 37 °C por 15 minutos, ao abrigo da luz.

A análise do potencial da membrana mitocondrial (PMM), bem como de espermatozoides sem desestabilização da membrana plasmática (SDM) e produção de ânion superóxido mitocondrial ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) seguiu o protocolo descrito por Carneiro et al. [29]. Desta forma as amostras de sêmen foram diluídas em meio TALP na concentração final de  $2 \times 10^6$  espermatozoides/mL, totalizando 500  $\mu\text{L}$  da suspensão, a qual foi incubada a 37 °C por 15 minutos na presença de 20 nM de MitoStatus Red (BD Phramigen, CA, USA), 50 nM de dihidroetídio (DHE, D23107, Life Technologies, CA, USA) e 7,5  $\mu\text{M}$  de Yo-Pro (YP, Y3603, Molecular Probes Inc., OR, USA).

A produção de peróxido de hidrogênio intracelular ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) foi avaliada a partir da sonda dihidrorodamina 123 (DHR; D23806, Life Technologies, CA, USA), na concentração de 2  $\mu\text{M}$ , associada com 1,5  $\mu\text{M}$  de IP, as quais foram adicionadas na suspensão de sêmen-TALP (500  $\mu\text{L}$ ;  $2 \times 10^6$  espermatozoides/mL), antes da incubação a 37 °C por 15 minutos.

A avaliação de peroxidação lipídica da membrana (PLM) foi realizada em amostras de sêmen induzidas ou não ao estresse oxidativo. Assim, a PLM foi testada na presença de 50  $\mu\text{M}$  de ácido aracdônico (PLM AA+; A3555, Sigma-Aldrich, MO, USA) a 37 °C por 15 minutos ou na sua ausência (PLM AA-). As alíquotas de sêmen com ácido aracdônico foram centrifugadas a 300 x g por 5 minutos (Excelsa II 206-BL, Fanem<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil), em meio TALP [30], antes da análise de PLM [28], para a qual foi empregada a sonda BODIPY<sup>™</sup> 581/591 C11 (D-3861; Molecular Probes, OR,

USA). Após a centrifugação, o “pellet” resultante foi ressuspenso em 500  $\mu$ L de meio TALP-PVA, assim como nos grupos não suplementados com AA. A seguir, as amostras de cada grupo foram coradas com 5  $\mu$ M de BODIPY e, posteriormente, incubadas a 37 °C por 30 minutos; após esse período, foram submetidas à duas lavagens consecutivas (centrifugação a 300 x g/5 minutos) em meio TALP-PVA, com subsequente diluição do “pellet” em 300  $\mu$ L do mesmo meio.

## 2.6 Análise estatística

ANOVA foi utilizada para a análise de cada variável de cinética e características morfofuncionais espermáticas, sendo fixados os efeitos do tratamento e os dois momentos da análise do sêmen pós-descongelamento (M5 e M60). A partida de sêmen também foi incluída como efeito fixo no modelo para corrigir potenciais efeitos de confusão. As diferenças entre os grupos de tratamento e os momentos foram analisadas usando o teste “post hoc Honest Significant Difference” (HSD) de Tukey. O nível de significância de  $\alpha = 0,05$  foi adotado em todas as comparações.

Antes da análise estatística, os “boxplots” de todas as variáveis investigadas foram inspecionados para verificar as hipóteses distributivas do modelo ANOVA. Para as variáveis que apresentaram desvios substanciais da normalidade (avaliados por coeficientes de assimetria) foi aplicada a transformação “Box-Cox” e a análise estatística repetida nos dados transformados. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o *software* R v3.4.4 (R CORE TEAM, 2018).

## 3. RESULTADOS

A amostra resultante do “pool”, após reavaliação, apresentou  $66,7\% \pm 1,7$  de motilidade progressiva, vigor  $4,0 \pm 0,0$ , concentração final de  $1925,7 \pm 115,0$  espermatozoides/mL e alterações morfológicas caracterizadas por defeitos totais ( $6,3\% \pm 1,8$ ), defeitos maiores de ( $3,3\% \pm 1,3$ ) e defeitos menores de ( $3,0\% \pm 2,0$ ).

Como mostrado na Figura Suplementar S1-A, apenas para as variáveis ALH e LIN os valores foram discrepantes e, conseqüentemente, foram submetidos à transformação “Box-Cox” (Figura Suplementar S1-B). No entanto, a análise dos dados não transformados gerou resultados muito semelhantes e, assim, somente foram considerados no modelo ANOVA os resultados dos dados não transformados.

Os resultados da adição do Ge132 e da incubação prévia a refrigeração sobre a motilidade e velocidade espermática são apresentados na Figura 1, sendo indicados

como diferença entre os valores, ou seja, de quanto foi o aumento ou diminuição dos mesmos. A Tabela Suplementar S1 representa os referidos dados, mas contempla o valor exato de cada variável. A MT foi maior ( $P < 0,05$ ) no R0 do que no D0, D500 e R1000, resultando em maior diferença em porcentagem entre os valores. Diferenças significativas foram observadas dentre os grupos de tratamento para os dois momentos (M5 e M60) de análise espermática para a MT, ALH, LIN e STR. A MT diminuiu no M60 nos grupos R500 e R1000. Da mesma forma, valores para ALH decresceram nos grupos D0, D500 e R500. No entanto, houve aumento médio da LIN ( $P < 0,05$ ) no grupo D1000, enquanto um acréscimo da STR foi observado ( $P < 0,05$ ) nos grupos D1000, R500 e R1000.

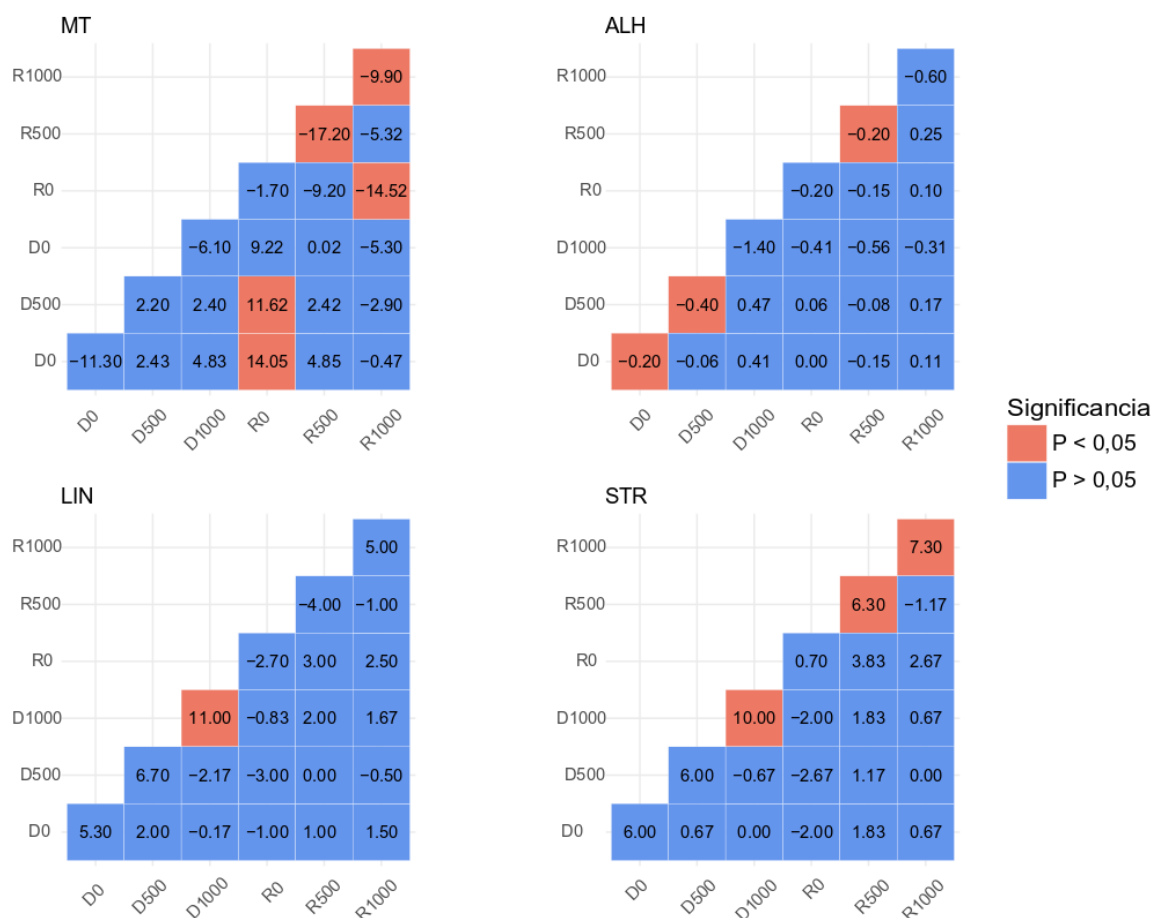


Figura 2. Teste de Tukey's honest para determinar diferenças estatísticas entre as variáveis de cinética espermática para os efeitos de tratamento e momento da análise espermática ( $P < 0,05$ ) no modelo da ANOVA. Os elementos que estão fora da diagonal representam diferenças médias (eixo x – eixo y) entre os tratamentos (R0, R500, R1000, D0, D500, D1000), enquanto os elementos presentes na diagonal representam diferenças médias para o mesmo grupo no momento da análise espermática (eixo x: M5 e eixo y: M60). Somente são exibidos os gráficos das variáveis que apresentaram diferença significativa (ver legenda). Motilidade total (MT; %), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH;  $\mu\text{m}$ ), linearidade (LIN; %) e progressividade (STR; %).

A distribuição das variáveis espermáticas analisadas por meio de sondas fluorescentes, em citômetro de fluxo, está descrita na Figura Suplementar S2 e, com base nos valores dos coeficientes de assimetria obtidos, a transformação dos dados não foi necessária, com os resultados exibidos na Tabela 1. Maior porcentagem ( $P < 0,05$ ) de MPAI foi observada no R500 do que nos grupos D0, D1000 e R1000, porém, não foi observada diferença significativa entre R500, D500 e R0. Efeito do tratamento foi observado no R500 em relação ao D1000, o qual apresentou maior ( $P < 0,05$ ) porcentagem de espermatozoides sem desestabilização de membrana. Todavia, para os dados de produção de ânion superóxido, expressos como intensidade de fluorescência, foi constatada menor geração no R0 em comparação com os demais grupos de tratamento, exceto para o R500. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os grupos para as variáveis  $H_2O_2$  e PMM.

Na Tabela 2 foram descritos os resultados da peroxidação lipídica da membrana espermática na presença ou ausência de indução de estresse oxidativo. Maior ( $P < 0,05$ ) intensidade de fluorescência foi encontrada nos subgrupos PLMAA+ do que nos subgrupos PLMAA-. Porém, analisando-se os dados referentes à PLMAA- e PLMAA+, dentro de cada grupo, menor produção de peroxidação foi constatada no D1000 em comparação com o R0, com resultados similares entre os demais grupos.

Tabela 1

Efeito do Ge132 adicionado ao meio de congelamento de sêmen bovino diluído e incubado a 33 °C/30 minutos (D) ou diluído e imediatamente refrigerado (R) sobre as características morfofuncionais espermáticas avaliadas com sondas fluorescentes em citômetro de fluxo pós-descongelamento.

Grupos	Características espermáticas				
	MPAI	SDM	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	O <sub>2</sub> <sup>-•</sup>	PMM
D0	58,22 ± 0,88 <sup>bc</sup>	45,02 ± 2,36 <sup>ab</sup>	607,00 ± 173,33 <sup>a</sup>	3380,17 ± 401,86 <sup>a</sup>	5011,33 ± 2817,23 <sup>a</sup>
D500	61,85 ± 1,35 <sup>abc</sup>	50,27 ± 1,19 <sup>ab</sup>	1152,33 ± 513,32 <sup>a</sup>	3453,00 ± 467,17 <sup>a</sup>	5218,67 ± 2094,97 <sup>a</sup>
D1000	56,42 ± 2,13 <sup>c</sup>	42,40 ± 1,89 <sup>b</sup>	556,67 ± 99,82 <sup>a</sup>	3514,17 ± 235,12 <sup>a</sup>	5782,33 ± 2581,87 <sup>a</sup>
R0	64,80 ± 1,92 <sup>ab</sup>	49,95 ± 2,37 <sup>ab</sup>	753,67 ± 239,57 <sup>a</sup>	2194,33 ± 220,21 <sup>b</sup>	6783,67 ± 1451,19 <sup>a</sup>
R500	66,78 ± 1,26 <sup>a</sup>	50,78 ± 2,58 <sup>a</sup>	824,00 ± 285,60 <sup>a</sup>	2821,17 ± 268,66 <sup>ab</sup>	7510,17 ± 1908,51 <sup>a</sup>
R1000	56,60 ± 2,14 <sup>c</sup>	44,87 ± 1,78 <sup>ab</sup>	750,00 ± 224,49 <sup>a</sup>	3378,00 ± 531,39 <sup>a</sup>	5815,33 ± 2373,90 <sup>a</sup>

<sup>a,b,c</sup> Valores com diferentes superescritos na coluna mostram diferença significativa entre os grupos ( $P < 0,05$ ).

Dados de três repetições foram combinados e expressos como média ± erro padrão da média.

MPAI (%): Membrana plasmática e acrossomal íntegra; SDM (%): Espermatozoide sem desestabilização de membrana; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (UA): peróxido de hidrogênio; O<sub>2</sub><sup>-•</sup> (UA): ânion superóxido e PMM (UA): potencial da membrana mitocondrial.

Tabela 2

Efeito do Ge132 suplementado ao meio de congelamento de sêmen bovino sobre a peroxidação lipídica da membrana espermática na presença (AA+) ou ausência (AA-) do ácido aracdônico, pós-descongelamento,

Grupos	Peroxidação lipídica da membrana espermática (UA)	
	AA-	AA+
D0	268,67 ± 29,10 <sup>ABa</sup>	699,00 ± 33,29 <sup>ABb</sup>
D500	226,67 ± 20,25 <sup>ABa</sup>	472,67 ± 24,84 <sup>ABb</sup>
D1000	225,00 ± 34,30 <sup>Ba</sup>	434,33 ± 65,30 <sup>Bb</sup>
R0	250,67 ± 35,41 <sup>Aa</sup>	775,00 ± 107,68 <sup>Ab</sup>
R500	261,33 ± 43,28 <sup>ABa</sup>	479,00 ± 84,33 <sup>ABb</sup>
R1000	245,67 ± 27,28 <sup>ABa</sup>	460,33 ± 29,10 <sup>ABb</sup>

<sup>a,b</sup> Valores com diferentes superescritos na linha mostram diferença significativa dentro do grupo, com ou sem a adição de AA ( $P < 0,05$ ).

<sup>A,B</sup> Valores com diferentes superescritos na coluna mostram diferença significativa entre os grupos ( $P < 0,05$ ).

Dados de três repetições foram combinados e expressos como média ± erro padrão da média.

D: Amostras diluídas e mantidas a 33 °C/30 minutos; R: Amostras diluídas e imediatamente refrigeradas a 4 °C por 5 horas.

#### 4. DISCUSSÃO

O bis-carboxietil sesquióxido germânio é conhecido por sua atividade antioxidante [9,32] e aplicabilidade na clínica hospitalar [13,33], cujo efeito se dá pela facilidade de doar elétrons aos radicais livres, diminuindo os danos sobre a membrana celular, bem como por meio de sua capacidade transportadora dessas moléculas instáveis [18,19]. O objetivo da subdivisão, em subgrupos D e R, foi verificar se o tempo de incubação da célula espermática com o Ge132, mantendo-se a atividade metabólica espermática nessa temperatura, interferiria na ação do antioxidante.

O Ge132 não alterou as características de motilidade total dos espermatozoides nos grupos de tratamento, podendo não ser capaz de manter valores de motilidade total após o congelamento como o grupo R0 o qual apresentou maiores resultados para a MT em relação aos tratados. Apesar de a motilidade total ser reconhecida como uma característica essencial para o transporte do espermatozoide ao sítio de fertilização [34], quando

considerada como única característica de movimento para prever a fertilidade após testes *in vivo*, apresenta baixa correlação com a fertilidade [35], diferentemente da VSL para a qual existe relato de correlação positiva com a capacidade fertilizante do espermatozoide bovino [36]. No entanto, ainda que a VSL não tenha diferido significativamente nos grupos testados no presente trabalho a porcentagem de espermatozoides com LIN e STR aumentou nos grupos com Ge132 no M60, indicando possível efeito benéfico do Ge132 sobre a cinética do espermatozoide, devido ao fato de essas variáveis serem resultantes da combinação da VSL com VCL e da VSL com VAP.

Nesse sentido, as características de velocidade têm sido mais efetivas para prever a fertilidade do sêmen bovino do que a motilidade [36,37], com a linearidade apresentando correlação positiva com a fertilidade em testes de campo utilizando protocolo de inseminação artificial [37,38]. Nossos dados, levando-se em conta as características de velocidade espermática, evidenciaram aumento das mesmas, ainda que, sugerindo tendência benéfica da diminuição dos valores da VCL, VSL, VAP e ALH, bem como aumento dos valores de BCF, LIN e STR no M5 e M60. Entretanto, a MT e MP, embora não significativamente diferentes, foram inferiores, quando considerados também o M5 e M60. Todavia, caso as análises tivessem sido feitas somente no M5, não seria possível caracterizar o provável benefício da incubação sobre a cinética espermática, uma vez que os valores para a VCL e ALH estavam aumentados e os de LIN diminuídos no M5, sugestivo de espermatozoides hiperativados [39]. Assim, quando as análises foram repetidas no M60, redução da VCL e da ALH foi pronunciada, bem como o aumento da LIN, ou seja, características de espermatozoides não hiperativados, as quais são observadas fisiologicamente no oviduto de mamíferos, onde preferencialmente são estocados espermatozoides não capacitados [40]. Desta forma, por exemplo, os valores da média para a ALH e LIN no D1000, inicialmente, de 2,91  $\mu\text{m}$  e 49% passaram para 1,51  $\mu\text{m}$  e 60%, respectivamente, assim como no R1000, no qual a ALH caiu de 2,20  $\mu\text{m}$  para 1,6  $\mu\text{m}$ . Sendo assim, embora não tenha havido diferença significativa entre médias no M60, os valores foram expressivos e caso o tempo de incubação tivesse sido maior, por exemplo, para 180 minutos, possivelmente diferenças estatísticas poderiam ser observadas. A avaliação do sêmen no M60 foi imprescindível para se atestar a efetiva qualidade da amostra e a ausência de efeito tóxico do Ge132 sobre células espermáticas. Além disso,

talvez com maior tempo de incubação um efeito pronunciado do Ge132 poderia ser observado, como relatado Sapanidou et al [41], os quais observaram efeito benéfico do extrato de bagaço de uva adicionado ao sêmen bovino após incubação de 120 e 240 minutos, pós-descongelamento.

A amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH) pode afetar a habilidade do espermatozoide humano em fertilizar o oócito, aumentando a distancia percorrido pela célula espermática juntamente com maior gasto de energia [39]. No entanto, a ausência de relatos da utilização do Ge132 em meios de refrigeração e congelamento do sêmen impossibilita uma discussão específica e, sendo assim, as comparações foram feitas com resultados de experimentos utilizando diferentes antioxidantes, nas mais variadas espécies. Sapanidou et al. [41] investigaram o efeito do extrato de bagaço de uva, rico em polifenóis, adicionado ao sêmen bovino, logo após o descongelamento e centrifugação da amostra, sobre as características de movimento, viabilidade e peroxidação lipídica de membrana espermática. A porcentagem de espermatozoides rápidos foi maior no grupo tratado com 5 µg/mL do extrato, após duas horas da incubação, em comparação com o controle, porém, não influenciou positivamente as características cinéticas de VCL, VSL, VAP e ALH. Em nosso estudo, os resultados para VCL, VSL e VAP foram similares àqueles observados por Sapanidou et al. [41], exceto para a ALH, a qual apresentou menores valores nos grupos R500, D500 e D0 no M60, caracterizando assim um movimento com maior linearidade, com menor amplitude de deslocamento da cabeça, desejáveis para espermatozoides não capacitados [39].

Rossi et al. [42] relataram que a suplementação do meio de congelamento de sêmen equino com a coenzima Q10, conjugada ou não a vitamina E, não foi capaz de manter percentuais favoráveis da motilidade total, pós-descongelamento. Os autores sugeriram que a ausência do efeito benéfico sobre a MT decorreu do curto tempo de equilíbrio (60 minutos a 4°C) entre a coenzima Q10, vitamina E, glicerol e sêmen, pré-congelamento. Em nosso estudo o tempo de equilíbrio provavelmente não foi o fator responsável pela diminuição da porcentagem da motilidade total, uma vez que o tempo de refrigeração de 5 horas é rotineiramente utilizado no pré-congelamento de sêmen bovino. Neste caso, uma plausível explicação pode ter sido a formação de complexos Ge132-ATP, previamente, reportada por Nakamura et al. (2015) [43], levando a retenção de moléculas de ATP e,

consequente diminuição da oferta de energia necessária para o metabolismo espermático, sugerindo, desta forma, os menores valores de MT encontrados no presente estudo. Resultados similares para motilidade total foram relatados por Tvrdá et al. [44], após utilização de resveratrol como agente antioxidante no sêmen bovino, os quais observaram queda significativa da MT e da atividade mitocondrial no grupo com 200  $\mu\text{M/L}$  de resveratrol, indicando provável ação inibidora sobre os canais iônicos, da membrana mitocondrial, especificamente envolvidos na produção de ATP [45].

A manutenção da integridade da membrana plasmática é essencial para a manutenção da viabilidade do espermatozoide [46], sendo considerada como característica mais importante para atestar a capacidade fertilizante do espermatozoide do que a motilidade espermática [37]. Najaf et al. [47] analisando os efeitos da cisteamina e da ergothioneina adicionados ao meio de congelamento de sêmen de carneiro, logo após o descongelamento, observaram maiores valores de MT e de integridade de membrana plasmática. Em contraste, e consideradas as diferentes metodologias adotadas, nossos dados revelaram apenas menor valor de MT no R500, mesmo em amostras com maiores porcentagens de integridade de membrana plasmática e acrossomal e espermatozoides sem desestabilização de membrana, sugerindo possível influência positiva do Ge32 sobre a membrana plasmática e/ou acrossomal do espermatozoide, e indicando, ainda que, alguns espermatozoides podem estar em um estado de quiescência ao descongelamento. Tal ação protetora do Ge132 foi descrita na estabilização da membrana plasmática de eritrócitos [15] e leucócitos humanos [16], a partir da impermeabilização da membrana ao íon cálcio [15] e imobilização de proteínas quinase C, fosfolipases e de fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina [18].

Tvrdá et al. [6] verificaram aumento da motilidade total e potencial de membrana mitocondrial, bem como queda da concentração de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , quando testaram a adição de 1000  $\mu\text{M/L}$  e 2000  $\mu\text{M/L}$  de licopeno no sêmen fresco bovino. Os autores demonstram que esse carotenoide é capaz de atuar nos primeiros insultos oxidativos, ou seja, reduzindo o  $\text{O}_2$  gerado durante a atividade mitocondrial. Diferentemente de Tvrdá et al. [6], relatando a ação do licopeno como redutor específico do ânion superóxido, bem como agente indutor da enzima superóxido dismutase, no nosso estudo, pelo menos nas concentrações adotadas, observamos limitada ou reduzida capacidade antioxidante do Ge132, quando consideradas

as mensurações de PMM,  $H_2O_2$  e  $O_2^{\cdot-}$ , imediatamente após a descongelação do sêmen. Talvez, utilizando-se concentrações mais elevadas e/ou diferentes períodos de incubação um efeito benéfico evidente fosse caracterizado. Esses resultados, em conjunto, sugerem uma ação mais efetiva do Ge132 sobre a funcionalidade da membrana plasmática do que sobre a geração de radicais livres, uma vez que, nenhuma diferença significativa foi observada nos valores para o potencial de membrana mitocondrial e geração de peróxido de hidrogênio, bem como, menor produção de ânion superóxido apenas no grupo controle.

A avaliação da peroxidação lipídica da membrana revelou efeito benéfico do tratamento no D1000 na ausência ou presença de estresse oxidativo, induzido pela adição de ácido aracdônico nas amostras de sêmen, pós-descongelamento. A realização do teste de indução de estresse oxidativo no sêmen foi relevante, pois pode evidenciar o efeito antioxidante do composto investigado, tendo sido relatada a existência de correlação positiva com fertilidade *in vivo* como demonstrado por Sellen et al. [50], quando da utilização do  $H_2O_2$  no teste de indução oxidativa, em sêmen bovino. O Ge132 também foi descrito como antioxidante de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) [17], por meio da transferência de elétrons [51], bem como inibidor da glicação dessas proteínas de baixa densidade [52] e mantenedor da viabilidade da vitamina E, cuja ação antioxidante sobre a LDL é bem descrita [53]. Assim, pode-se esperar uma atuação protetora do Ge132 sobre a LDL da gema de ovo presente no diluente de congelação, conferindo, de certa forma, maior disponibilidade do mesmo para a proteção da membrana espermática. De conhecimento, tal lipoproteína está implicada na ligação com proteínas capacitantes presentes no plasma seminal, ligação essa que evita o efluxo de colesterol e fosfolipídios da membrana, estabilizando-a [54]. A maior proteção aos espermatozoides, quando submetidos ao estresse oxidativo pelo ácido aracdônico, pós-descongelamento, poderia minimizar os danos oriundos da peroxidação da membrana. Sapanidou et al. [41] observaram menor porcentagem de peroxidação lipídica da membrana de espermatozoides bovinos incubados com polifenol e, mesmo que esse resultado tenha sido explicado de maneira distinta, por meio da proteção aos fosfolipídios de membrana, existem evidências da ação antioxidante dos polifenóis sobre lipoproteínas de baixa densidade em estudos *in vitro* com linfócitos humano [55].

Os grupos de tratamento pré-incubados com o Ge132, nas concentrações de 500 ou 1000 µg/ml, a 33 °C por trinta minutos antes da refrigeração (D) apresentaram manutenção dos valores de motilidade total espermática pós-descongelamento nos momentos M5 e M60, quando comparados com os grupos também adicionados de Ge132, mas imediatamente refrigerados a 4 °C (R). No entanto, a hipótese de que o Ge132 exerce papel na manutenção da motilidade total, mesmo no M60, decorrer de uma possível ação protetora do Ge 132 sobre a LDL presente no diluente implicando na inibição da pré-capacitação espermática precoce ainda precisa ser elucidada por meio de outras investigações.

Sabidamente, o efeito antioxidante do Ge132 é conferido por sua capacidade de capturar ou neutralizar os elétrons desemparelhados [10]. Além disso, sua ação quelante sobre os metais de transição [17] pode promover a inibição da cascata da peroxidação lipídica, a qual depende da concentração de íons de ferro ou cobre para seu início e propagação [20,21]. A ação catalítica do  $Fe^{2+}$  é necessária na reação de Haber-Weiss ( $O_2^{\cdot-}$  e o  $H_2O_2$ ), resultando na formação do  $OH^{\cdot}$  e início da PLM, culminando na fase da propagação, quando o  $Fe^{2+}$  combina-se com o  $H_2O_2$  para gerar  $OH^{\cdot}$  [20,21]. Contudo, o mecanismo de ação por meio do qual o Ge132 reduziu a PLM dos espermatozoides não ficou estabelecido em nosso estudo, podendo ser devido tanto à sua capacidade de doar elétrons e/ou atuar como agente quelante de metais de transição, como agente estabilizador da membrana do espermatozoide. Assim, a diminuição da peroxidação lipídica da membrana espermática tem sido relatada por diversos autores quando antioxidantes como o resveratrol [56], o extrato do bagaço da uva [41] e a cisteamina [47] foram adicionados ao sêmen humano, bovino e ovino, respectivamente. Similarmente, Sapanidou et al. [7] relataram que o Crocin foi efetivo na proteção dos espermatozoides bovinos contra a peroxidação lipídica, após adição ao sêmen descongelado e posteriormente utilizado na fertilização *in vitro*. Logo, os compostos antioxidantes expostos, de forma geral, atuam de forma benéfica sobre as células espermáticas, predominando efeito antioxidante como varredores de radicais livres especificamente, diferentemente do que foi observado com a utilização do Ge132, com ação mais eminente sobre proteção da membrana espermática contra a peroxidação lipídica de membrana.

Embora tenha ocorrido menor produção de  $O_2^{\cdot-}$  no grupo R0 em comparação com os demais, não se pode afirmar se os níveis detectados em todos os grupos foram elevados ou

baixos, ao ponto de induzir a peroxidação lipídica de membrana, uma vez que na literatura não foram encontradas citações sobre valores de referência para PMM e  $O_2^{\cdot-}$ , bem como para as outras características seminais estudadas usando sondas fluorescentes em citômetro de fluxo, tendo como unidade, principalmente, a intensidade de fluorescência. O  $O_2$ , entretanto, é convertido dentro da mitocôndria em  $O_2^{\cdot-}$  e, posteriormente, transformado em  $H_2O_2$  pela superóxido dimutase. Considerando um metabolismo espermático acelerado, isto é, com altos valores de MT e/ou MP, dentro de parâmetros fisiológicos, é de se esperar aumento na geração de  $H_2O_2$  e, conseqüentemente, maior peroxidação lipídica de membrana, ficando na dependência dos níveis de antioxidantes presentes, principalmente da catalase na célula espermática ou disponíveis no meio de congelação. Por outro lado, a maior produção de  $H_2O_2$  pode estar relacionada com a atividade da membrana mitocondrial, uma vez que maior consumo de  $O_2$  pelo espermatozoide implica em maior produção de ATP e, subseqüentemente maior potencial de membrana mitocondrial. No entanto, nossos resultados não evidenciaram de forma efetiva tais mecanismos de ação, pois o grupo que apresentou menor valor de  $O_2^{\cdot-}$  não foi aquele que produziu mais  $H_2O_2$  nem maior atividade mitocondrial, bem como não deu origem a uma menor geração de peroxidação.

Portanto, de modo geral, o efeito antioxidante do Ge132 adicionado ao meio de congelamento de sêmen bovino não foi tão evidente, entretanto, o Ge132 de certa forma, pode contribuir para o potencial fertilizante da amostra, levando-se em consideração alguns achados de cinética espermática, como a LIN, STR e ALH, previamente reportados na literatura como parâmetros importantes para predizer a capacidade fertilizante no espermatozoide. Da mesma forma, as avaliações morfofuncionais dos espermatozoides não evidenciaram influência deletéria do Ge132, uma vez que os valores obtidos para  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$ , PMM e SDM, foram similares entre os grupos, evidenciando manutenção do metabolismo espermático. Além disso, o Ge132 parece ter conferido proteção contra a PLM quando submetido ao estresse oxidativo.

## **CONFLITOS DE INTERESSE**

Os autores atestam que não há nenhum tipo de conflito de interesse.

## **COLABORADORES**

Todos os autores contribuíram substancialmente para a realização da pesquisa e redação do artigo. Tairini Cruz, Alicio Martins Jr. e Eunice Oba idealizaram o estudo proposto. Tairini Cruz, Alicio Martins Jr., Fernanda Marqui e Tatiana Berton foram responsáveis pela colheita, processamento e análises preliminares das amostras de sêmen. Diego Souza e Camila Dell'Aqua foram responsáveis pelas análises espermáticas computadorizadas e citometria de fluxo, respectivamente.

## **FINANCIAMENTO**

Este trabalho foi apoiado, em parte, pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), São Paulo, Brasil.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaríamos de expressar nosso agradecimento a Botupharma Biotecnologia Animal, Botucatu, Brasil pela doação do meio de congelamento de sêmen e a Central de Inseminação Artificial Tairana pela cessão dos animais e laboratório de congelamento de sêmen. Agradecemos também a participação do professor Yuri Tani Utsunomiya na análise estatística dos dados.

## **APÊNDICE DOS DADOS SUPLEMENTARES**

Os dados suplementares são apresentados na Figuras Suplementares S1 e S2 e na Tabela Suplementar S1.

## **REFERÊNCIAS**

- [1] Martin G, Sabido O, Durand P, Levy R. Cryopreservation Induces an Apoptosis-Like Mechanism in Bull Sperm. *Biol Reprod* 2004;71:28–37. doi:10.1095/biolreprod.103.024281.
- [2] Sieme H, Oldenhof H, Wolkers WF. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Anim Reprod Sci* 2016;169:2–5. doi:10.1016/j.anireprosci.2016.02.004.
- [3] Ortega FC, González FL, Morrell JM, Salazar SC, Macías GB, Rodríguez-Martinez H, et al. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C 11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to

- apoptotic-like changes. *Reproduction* 2009;138:55–63. doi:10.1530/REP-08-0484.
- [4] Ford WCL. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Hum Reprod Update* 2004;10:387–99. doi:10.1093/humupd/dmh034.
- [5] Agarwal A, Virk G, Ong C, du Plessis SS. Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. *World J Mens Health* 2014;32:1. doi:10.5534/wjmh.2014.32.1.1.
- [6] Tvrdá E, Lukáč N, Jambor T, Lukáčová J, Hashim F, Massányi P. In vitro supplementation of lycopene to bovine spermatozoa: Effects on motility, viability and superoxide production. *Anim Sci Pap Reports* 2016;34:319–28. doi:10.15414/jmbfs.2015.4.4.336-341.
- [7] Sapanidou V, Taitzoglou I, Tsakmakidis I, Kourtzelis I, Fletouris D, Theodoridis A, et al. Antioxidant effect of crocin on bovine sperm quality and in vitro fertilization. *Theriogenology* 2015;84:1273–82. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.07.005.
- [8] Yang MK, Kim YG. Protective role of germanium-132 against paraquat-induced oxidative stress in the livers of senescence-accelerated mice. *J Toxicol Environ Heal - Part A* 1999;58:289–97. doi:10.1080/009841099157250.
- [9] Tezuka T, Higashino A, Akiba M, Nakamura T. Organogermanium (Ge-132) Suppresses Activities of Stress Enzymes Responsible for Active Oxygen Species in Monkey Liver Preparation. *Adv Enzym Res* 2017;05:13–23. doi:10.4236/aer.2017.52002.
- [10] Wada T, Hanyu T, Nozaki K, Kataoka K, Kawatani T, Asahi T, et al. Antioxidant activity of Ge-132, a synthetic organic germanium, on cultured mammalian cells. *Biol Pharm Bull* 2018;41:749–53. doi:10.1248/bpb.b17-00949.
- [11] Matsumoto H, Iwafuji H, Yamane J, Takeuchi R, Utsunomiya T, Fujii A. Restorative effect of organic germanium compound (Ge-132) on dermal injury. *Wound Med* 2016;15:6–10. doi:10.1016/j.wndm.2016.09.001.
- [12] Ogwapit SM. Analysis of Ge-132 and development of a simple oral anticancer formulation. *Biosci Horizons* 2011;4:128–39. doi:10.1093/biohorizons/hzr015.
- [13] Sijpesteijn, A.K.; Rijkens, F.; Van Der Kerk, G.J.; Manten A. Antimicrobial Activity of Organogermanium Derivatives. *Nature* 1964;201:736.
- [14] NAKAMURA T, SAITO M, ASO H. Effects of a Lactobacilli, Oligosaccharide and Organic Germanium Intake on the Immune Responses of Mice. *Biosci Biotechnol Biochem* 2012;76:375–7. doi:10.1271/bbb.110655.
- [15] Li SP, Xie WL, Cai HH, Cai JY, Yang PH. Hydroxyl radical scavenging mechanism of human erythrocytes by quercetin-germanium (IV) complex. *Eur J Pharm Sci* 2012;47:28–34. doi:10.1016/j.ejps.2012.04.019.
- [16] Prónai L, Arimori S. Protective effect of carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132) on superoxide generation by <sup>60</sup>Co-irradiated leukocytes. *Biotherapy* 1991;3:273–9.
- [17] Wakabayashi Y. Effect of germanium-132 on low-density lipoprotein oxidation and atherosclerosis in Kurosawa and Kusanagi hypercholesterolemic rabbits. *Biosci Biotechnol Biochem* 2001;65:1893–6. doi:10.1271/bbb.65.1893.
- [18] Kim E, Jeon Y, Kim DY, Lee E, Hyun SH. Antioxidative effect of carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132) on IVM of porcine oocytes and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and IVF. *Theriogenology* 2015;84:226–36. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.03.006.
- [19] Kim E, Hwang S-U, David YOON J, Jeung E-B, Lee E, Young KIM D, et al. Carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132) treatment during in vitro culture

- protects fertilized porcine embryos against oxidative stress induced apoptosis. *J Reprod Dev* 2017;63:581–90. doi:10.1262/jrd.2017-020.
- [20] Metzendorf C, Lind MI. *Drosophila mitoferrin* is essential for male fertility: evidence for role of mitochondrial iron metabolism during spermatogenesis. *BMC Dev Biol* 2010;10:68.
- [21] Morales C, Sylvester SR, Griswold MD. Transport of iron and transferrin synthesis by the seminiferous epithelium of the rat in vivo. *Biol Reprod* 1987;37:995–1005. doi:10.1095/biolreprod37.4.995.
- [22] Chen SJ, Allam JP, Duan YG, Haidl G. Influence of reactive oxygen species on human sperm functions and fertilizing capacity including therapeutical approaches. *Arch Gynecol Obstet* 2013;288:191–9. doi:10.1007/s00404-013-2801-4.
- [23] Perera D, Pizzey A, Campbell A, Katz M, Porter J, Petrou M, et al. Sperm DNA damage in potentially fertile homozygous beta-thalassaemia patients with iron overload. *Hum Reprod* 2002;17:1820–5. doi:10.1093/humrep/17.7.1820.
- [24] Gerber GB, Léonard A. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of antimony compounds 1997;387:141–6.
- [25] W K. Das geographische system der klimate 1936:1–44.
- [26] CBRA (Colégio Brasileiro de Reprodução Animal). Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3a ed. Belo Horizonte. 2013.
- [27] Parrish J, Susko-Parrish J, Winer M, First N. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biol Reprod* 1988;38:1171–80.
- [28] Guasti PN, Freitas-Dell'Aqua CP, Maziero RRD, Hartwig FP, Monteiro GA, Lisboa FP, et al. Validation of flow cytometry for assessment of membrane lipid peroxidation of equine spermatozoa. IV Int. Symp. Anim. Biol. Reprod. Anim. Reprod., 2012.
- [29] Carneiro JAM, Canisso IF, Bandeira RS, Scheeren VFC, Freitas-Dell'Aqua CP, Alvarenga MA, et al. Effects of coenzyme Q10 on semen cryopreservation of stallions classified as having good or bad semen freezing ability. *Anim Reprod Sci* 2018;192:107–18. doi:10.1016/j.anireprosci.2018.02.020.
- [30] Freitas-Dell'Aqua CP, Sancler-Silva YFR, Silva-Jr ER, Dell'Aqua JA, Papa FO. Determination of intracellular and mitochondrial superoxide generation and high mitochondrial membrane potential in equine sperm using flow cytometry. *J Equine Vet Sci* 2016;43:S69–70. doi:10.1016/j.jevs.2016.06.039.
- [31] R Foundation for Statistical Computing. R Core Team: A language and Environment for Statistical Computing. 2018.
- [32] Nakamura T, Nagura T, Akiba M, Sato K, Tokuji Y, Ohnishi M, et al. Promotive Effects of the Dietary Organic Germanium Poly-trans-[(2-carboxyethyl) germasesquioxane] (Ge-132) on the Secretion and Antioxidative Activity of Bile in Rodents. *J Heal Sci* 2010;56:72–80. doi:10.1248/jhs.56.72.
- [33] Furusawa S, Fujimura T, Hashimoto I, Kitagawa Y, Sasaki K, Takayanagi G. Effect of 2 carboxyethylgermanium sesquioxide (Ge-132) on granuloma formation in rats. *Tohoku Yakka Daigaku Kenkyu Nempo* 1987;34:263–268.
- [34] Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer Assisted Semen Analysers In Andrology Reserch and Veterinary Practice. *Theriogenology* 2002;57:149–79. doi:10.1002/j.1939-4640.2000.tb03268.x.
- [35] Oliveira LZ, Arruda RP de, Andrade AFC de, Celeghini ECC, Reeb PD, Martins JPN, et al. Assessment of in vitro sperm characteristics and their importance in the

- prediction of conception rate in a bovine timed-AI program. *Anim Reprod Sci* 2013;137:145–55. doi:10.1016/j.anireprosci.2013.01.010.
- [36] Awad MM. Effect of some permeating cryoprotectants on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2011;123:157–62. doi:10.1016/j.anireprosci.2011.01.003.
- [37] Tardif AL, Farrell PB, Trouern-Trend V, Foote RH. Computer-Assisted Sperm Analysis for Assessing Initial Semen Quality and Changes During Storage at 5°C. *J Dairy Sci* 1997;80:1606–12. doi:10.3168/jds.S0022-0302(97)76091-0.
- [38] Byrd W, Bradshaw K, Carr B, Edman C, Odom J, Ackerman G. A prospective randomized study of pregnancy rates following intrauterine and intracervical insemination using frozen donor sperm. *Fertil Steril* 1990;53:521–7.
- [39] Aitken J, Fisher H. Reactive Oxygen Species Generation and Human Spermatozoa: The Balance of Benefit and Risk. *BioEssays* 1994;16:259–67.
- [40] Smith TT, Yanagimachi R. Attachment and release of spermatozoa from the caudal isthmus of the hamster oviduct. *J Reprod Fertil* 1991;91:567–73. doi:10.1530/jrf.0.0910567.
- [41] Sapanidou VG, Margaritis I, Siahos N, Arsenopoulos K, Dragatidou E, Taitzoglou IA, et al. Antioxidant effect of a polyphenol-rich grape pomace extract on motility, viability and lipid peroxidation of thawed bovine spermatozoa. *J Biol Res* 2014;21:1–6. doi:10.1186/2241-5793-21-19.
- [42] Rossi M, Falomo ME, Mantovani R. Role of coenzyme Q and vitamin E on stallion semen motility evaluated both in frozen and cooled-stored semen. *Ital J Anim Sci* 2016;15:595–603. doi:10.1080/1828051X.2016.1239511.
- [43] Nakamura T, Shimada Y, Takeda T, Sato K, Akiba M, Fukaya H. Organogermanium compound, Ge-132, forms complexes with adrenaline, ATP and other physiological cis-diol compounds. *Future Med Chem* 2015;7:1233–46. doi:10.4155/fmc-2016-0197.
- [44] Tvrdá E, Lukáč N, Jambor T, Lukáčová J, Hashim F, Massányi P. In vitro supplementation of resveratrol to bovine spermatozoa: Effects on motility, viability and superoxide production. *Anim Sci Pap Reports* 2015;4:336–41. doi:10.15414/jmbfs.2015.4.4.336-341.
- [45] Zheng J, Ramirez VD. Inhibition of mitochondrial proton F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase/ATP synthase by polyphenolic phytochemicals. *Brazilian J Pharmacol* 2000;130:1115–23. doi:http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0703397.
- [46] Rodríguez-Martínez H. State of the art in farm animal sperm evaluation. *Reprod Fertil Dev* 2007;19:91–101. doi:10.1071/RD06104.
- [47] Najafi A, Kia HD, Mohammadi H, Najafi MH, Zanganeh Z, Sharafi M, et al. Different concentrations of cysteamine and ergothioneine improve microscopic and oxidative parameters in ram semen frozen with a soybean lecithin extender. *Cryobiology* 2014;69:68–73. doi:10.1016/j.cryobiol.2014.05.004.
- [48] Liu Z, Foote RH. Bull Sperm Motility and Membrane Integrity in Media Varying in Osmolality. *J Dairy Sci* 1998;81:1868–73. doi:10.3168/jds.S0022-0302(98)75757-1.
- [49] De Leeuw AM, Den Daas JH., Woelders H. The Fix Vital Stain Method 1991;12:112–8.
- [50] Sellem E, Broekhuijse MLWJ, Chevrier L, Camugli S, Schmitt E, Schibler L, et al. Use of combinations of in vitro quality assessments to predict fertility of bovine semen. *Theriogenology* 2015;84:1447–54.

- doi:10.1016/j.theriogenology.2015.07.035.
- [51] Goodman S. Therapeutic effects of organic germanium. *Med Hypotheses* 1988;26:207–15. doi:10.1016/0306-9877(88)90101-6.
- [52] Shimojo N, Pan J., Yoshioka K, Ishii T, Nakajima C, Naka K, et al. Effects of organic germanium compounds on glycated plasma proteins in diabetic rat. *Clin Chem Enzymol Commun* 1993;5:179–84.
- [53] Esterbauer H, Jurgens G, Quenenberger O, Koller E. Autooxidation of human low density lipoprotein: loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes. *J Lipid Res* 1987;28:495–509.
- [54] Bergeron A, Crête M-H, Brindle Y, Manjunath P. Low-Density Lipoprotein Fraction from Hen's Egg Yolk Decreases the Binding of the Major Proteins of Bovine Seminal Plasma to Sperm and Prevents Lipid Efflux from the Sperm Membrane1. *Biol Reprod* 2004;70:708–17. doi:10.1095/biolreprod.103.022996.
- [55] Stagos D, Spanou C, Margariti M, Stathopoulos C, Mamuris Z, Kazantzoglou G, et al. Cytogenetic Effects of Grape Extracts ( *Vitis vinifera* ) and Polyphenols on Mitomycin C-Induced Sister Chromatid Exchanges ( SCEs ) in Human Blood Lymphocytes. *J Agric Ans Food Chem* 2007;55:5246–52.
- [56] Garcez ME, Dos Santos Branco C, Lara LV, Pasqualotto FF, Salvador M. Effects of resveratrol supplementation on cryopreservation medium of human semen. *Fertil Steril* 2010;94:2118–21. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.01.058.

TABELA Suplementar S1.

Valores da média  $\pm$  EPM da motilidade e cinética espermática dos grupos de tratamento e controle de amostras de sêmen conforme o momento da análise (MA; 5 e 60 min) pós-descongelamento

Ge132 $\mu\text{g/mL}$	MA	Características espermáticas									
		MT	MP	VCL	VSL	VAP	ALH	BCF	LIN	STR	
D0	5	60,30 $\pm$ 7,13 <sup>A</sup>	40,33 $\pm$ 6,59 <sup>A</sup>	168,83 $\pm$ 14,62 <sup>A</sup>	91,96 $\pm$ 14,37 <sup>A</sup>	120,37 $\pm$ 15,93 <sup>A</sup>	1,90 $\pm$ 0,03 <sup>A</sup>	4,97 $\pm$ 0,19 <sup>A</sup>	0,52 $\pm$ 0,03 <sup>A</sup>	0,73 $\pm$ 0,02 <sup>A</sup>	
	60	49,03 $\pm$ 8,59 <sup>A</sup>	36,50 $\pm$ 6,31 <sup>A</sup>	143,43 $\pm$ 13,10 <sup>A</sup>	86,09 $\pm$ 12,40 <sup>A</sup>	104,52 $\pm$ 13,04 <sup>A</sup>	1,69 $\pm$ 0,01 <sup>B</sup>	5,40 $\pm$ 0,09 <sup>A</sup>	0,57 $\pm$ 0,03 <sup>A</sup>	0,79 $\pm$ 0,02 <sup>A</sup>	
	<b>Média</b>	<b>54,67 <math>\pm</math> 5,59<sup>b</sup></b>	<b>38,42 <math>\pm</math> 4,17<sup>a</sup></b>	<b>156,13 <math>\pm</math> 10,46<sup>a</sup></b>	<b>89,03 <math>\pm</math> 8,59<sup>a</sup></b>	<b>112,44 <math>\pm</math> 9,87<sup>a</sup></b>	<b>1,80 <math>\pm</math> 0,05<sup>a</sup></b>	<b>5,19 <math>\pm</math> 0,14<sup>a</sup></b>	<b>0,55 <math>\pm</math> 0,02<sup>a</sup></b>	<b>0,76 <math>\pm</math> 0,02<sup>a</sup></b>	
D500	5	56,00 $\pm$ 4,91 <sup>A</sup>	38,33 $\pm$ 3,81 <sup>A</sup>	169,23 $\pm$ 14,99 <sup>A</sup>	89,93 $\pm$ 13,92 <sup>A</sup>	120,85 $\pm$ 17,09 <sup>A</sup>	1,94 $\pm$ 0,05 <sup>A</sup>	4,91 $\pm$ 0,22 <sup>A</sup>	0,53 $\pm$ 0,05 <sup>A</sup>	0,74 $\pm$ 0,02 <sup>A</sup>	
	60	58,20 $\pm$ 1,42 <sup>A</sup>	44,07 $\pm$ 2,32 <sup>A</sup>	136,68 $\pm$ 10,43 <sup>A</sup>	85,73 $\pm$ 9,58 <sup>A</sup>	102,56 $\pm$ 10,43 <sup>A</sup>	1,53 $\pm$ 0,03 <sup>B</sup>	5,23 $\pm$ 0,19 <sup>A</sup>	0,60 $\pm$ 0,03 <sup>A</sup>	0,80 $\pm$ 0,02 <sup>A</sup>	
	<b>Média</b>	<b>57,10 <math>\pm</math> 2,34<sup>b</sup></b>	<b>41,20 <math>\pm</math> 2,37<sup>a</sup></b>	<b>152,96 <math>\pm</math> 10,94<sup>a</sup></b>	<b>87,83 <math>\pm</math> 7,61<sup>a</sup></b>	<b>111,71 <math>\pm</math> 9,84<sup>a</sup></b>	<b>1,74 <math>\pm</math> 0,10<sup>a</sup></b>	<b>7,01 <math>\pm</math> 0,15<sup>a</sup></b>	<b>0,57 <math>\pm</math> 0,03<sup>a</sup></b>	<b>0,77 <math>\pm</math> 0,02<sup>a</sup></b>	
D1000	5	62,57 $\pm$ 5,90 <sup>A</sup>	37,33 $\pm$ 4,25 <sup>A</sup>	152,13 $\pm$ 10,49 <sup>A</sup>	78,98 $\pm$ 8,74 <sup>A</sup>	105,35 $\pm$ 10,75 <sup>A</sup>	2,91 $\pm$ 0,96 <sup>A</sup>	4,97 $\pm$ 0,18 <sup>A</sup>	0,49 $\pm$ 0,02 <sup>B</sup>	0,71 $\pm$ 0,01 <sup>B</sup>	
	60	56,43 $\pm$ 6,70 <sup>A</sup>	42,50 $\pm$ 2,61 <sup>A</sup>	126,18 $\pm$ 9,69 <sup>A</sup>	79,11 $\pm$ 6,65 <sup>A</sup>	93,51 $\pm$ 8,45 <sup>A</sup>	1,51 $\pm$ 0,02 <sup>A</sup>	5,58 $\pm$ 0,35 <sup>A</sup>	0,60 $\pm$ 0,01 <sup>A</sup>	0,81 $\pm$ 0,02 <sup>A</sup>	
	<b>Média</b>	<b>59,50 <math>\pm</math> 4,22<sup>ab</sup></b>	<b>39,92 <math>\pm</math> 2,51<sup>a</sup></b>	<b>139,16 <math>\pm</math> 8,63<sup>a</sup></b>	<b>79,05 <math>\pm</math> 4,91<sup>a</sup></b>	<b>99,43 <math>\pm</math> 6,66<sup>a</sup></b>	<b>2,21 <math>\pm</math> 0,53<sup>a</sup></b>	<b>5,27 <math>\pm</math> 0,22<sup>a</sup></b>	<b>0,55 <math>\pm</math> 0,03<sup>a</sup></b>	<b>0,76 <math>\pm</math> 0,02<sup>a</sup></b>	
R0	5	69,57 $\pm$ 4,33 <sup>A</sup>	47,33 $\pm$ 7,41 <sup>A</sup>	164,16 $\pm$ 13,35 <sup>A</sup>	93,11 $\pm$ 17,88 <sup>A</sup>	121,12 $\pm$ 18,02 <sup>A</sup>	1,91 $\pm$ 0,00 <sup>A</sup>	5,22 $\pm$ 0,27 <sup>A</sup>	0,55 $\pm$ 0,07 <sup>A</sup>	0,74 $\pm$ 0,04 <sup>A</sup>	
	60	67,87 $\pm$ 6,09 <sup>A</sup>	45,57 $\pm$ 3,92 <sup>A</sup>	142,73 $\pm$ 5,25 <sup>A</sup>	77,57 $\pm$ 6,57 <sup>A</sup>	99,77 $\pm$ 7,02 <sup>A</sup>	1,69 $\pm$ 0,09 <sup>A</sup>	5,31 $\pm$ 0,20 <sup>A</sup>	0,52 $\pm$ 0,02 <sup>A</sup>	0,74 $\pm$ 0,01 <sup>A</sup>	
	<b>Média</b>	<b>68,72 <math>\pm</math> 3,36<sup>a</sup></b>	<b>46,45 <math>\pm</math> 3,77<sup>a</sup></b>	<b>153,45 <math>\pm</math> 8,63<sup>a</sup></b>	<b>85,34 <math>\pm</math> 9,20<sup>a</sup></b>	<b>110,44 <math>\pm</math> 9,88<sup>a</sup></b>	<b>1,80 <math>\pm</math> 0,06<sup>a</sup></b>	<b>5,26 <math>\pm</math> 0,15<sup>a</sup></b>	<b>0,54 <math>\pm</math> 0,03<sup>a</sup></b>	<b>0,74 <math>\pm</math> 0,02<sup>a</sup></b>	
R500	5	68,10 $\pm$ 4,76 <sup>A</sup>	47,03 $\pm$ 2,39 <sup>A</sup>	159,02 $\pm$ 12,96 <sup>A</sup>	90,24 $\pm$ 9,33 <sup>A</sup>	116,27 $\pm$ 10,99 <sup>A</sup>	1,77 $\pm$ 0,04 <sup>A</sup>	5,18 $\pm$ 0,29 <sup>A</sup>	0,55 $\pm$ 0,01 <sup>A</sup>	0,75 $\pm$ 0,00 <sup>B</sup>	
	60	50,93 $\pm$ 3,33 <sup>B</sup>	38,63 $\pm$ 2,21 <sup>A</sup>	132,07 $\pm$ 13,99 <sup>A</sup>	81,41 $\pm$ 10,42 <sup>A</sup>	96,74 $\pm$ 11,56 <sup>A</sup>	1,53 $\pm$ 0,08 <sup>B</sup>	5,27 $\pm$ 0,21 <sup>A</sup>	0,59 $\pm$ 0,02 <sup>A</sup>	0,81 $\pm$ 0,01 <sup>A</sup>	
	<b>Média</b>	<b>59,52 <math>\pm</math> 4,64<sup>ab</sup></b>	<b>59,52 <math>\pm</math> 2,38<sup>a</sup></b>	<b>145,54 <math>\pm</math> 10,45<sup>a</sup></b>	<b>85,83 <math>\pm</math> 6,56<sup>a</sup></b>	<b>106,51 <math>\pm</math> 8,37<sup>a</sup></b>	<b>1,65 <math>\pm</math> 0,07<sup>a</sup></b>	<b>5,23 <math>\pm</math> 0,16<sup>a</sup></b>	<b>0,57 <math>\pm</math> 0,02<sup>a</sup></b>	<b>0,78 <math>\pm</math> 0,01<sup>a</sup></b>	
R1000	5	59,17 $\pm$ 3,03 <sup>A</sup>	38,97 $\pm$ 2,48 <sup>A</sup>	160,53 $\pm$ 11,74 <sup>A</sup>	89,82 $\pm$ 10,94 <sup>A</sup>	117,10 $\pm$ 12,76 <sup>A</sup>	2,20 $\pm$ 0,42 <sup>A</sup>	5,10 $\pm$ 0,20 <sup>A</sup>	0,54 $\pm$ 0,02 <sup>A</sup>	0,73 $\pm$ 0,01 <sup>B</sup>	
	60	49,23 $\pm$ 1,81 <sup>B</sup>	37,83 $\pm$ 0,87 <sup>A</sup>	136,36 $\pm$ 8,21 <sup>A</sup>	82,93 $\pm$ 5,55 <sup>A</sup>	99,23 $\pm$ 7,28 <sup>A</sup>	1,60 $\pm$ 0,02 <sup>A</sup>	5,38 $\pm$ 0,20 <sup>A</sup>	0,59 $\pm$ 0,02 <sup>A</sup>	0,80 $\pm$ 0,02 <sup>A</sup>	
	<b>Média</b>	<b>54,20 <math>\pm</math> 2,73<sup>b</sup></b>	<b>38,40 <math>\pm</math> 1,20<sup>a</sup></b>	<b>148,44 <math>\pm</math> 8,34<sup>a</sup></b>	<b>86,38 <math>\pm</math> 5,70<sup>a</sup></b>	<b>108,17 <math>\pm</math> 7,69<sup>a</sup></b>	<b>1,90 <math>\pm</math> 0,23<sup>a</sup></b>	<b>5,24 <math>\pm</math> 0,14<sup>a</sup></b>	<b>0,56 <math>\pm</math> 0,02<sup>a</sup></b>	<b>0,77 <math>\pm</math> 0,02<sup>a</sup></b>	

<sup>a,b</sup> Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferenças significativas entre os grupos ( $P < 0.05$ ).

<sup>A,B</sup> Letras maiúsculas diferentes na coluna indicam diferenças significativas dentro do grupo entre os momentos das análises pós-descongelamento (MA) ( $P < 0.05$ ).

MT= Motilidade Total (%), MP= Motilidade Progressiva (%), VCL= Velocidade curvilínea ( $\mu\text{m/s}$ ), VSL= Velocidade progressiva ( $\mu\text{m/s}$ ), VAP= Velocidade do trajeto ( $\mu\text{m/s}$ )  
ALH= Amplitude lateral da cabeça ( $\mu\text{m}$ ), BCF= Batimento flagelar (Hz), LIN= Linearidade (%), STR= Retilinearidade (%).

D: Amostras diluídas e mantidas a 33 °C/30 min antes da refrigeração; R: Amostras diluídas e imediatamente refrigeradas.

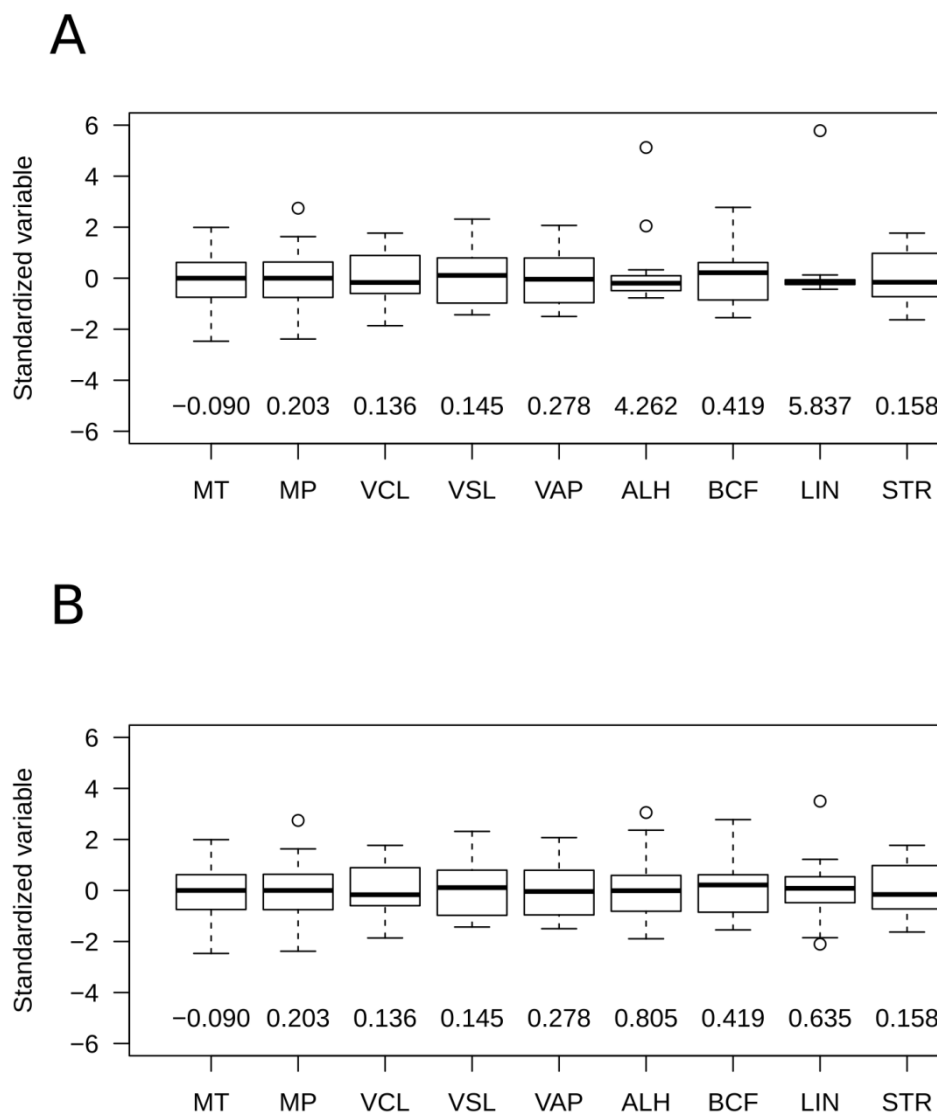


Figura Suplementar S1. A-B. Distribuição das variáveis espermáticas analisadas. Os valores abaixo de cada “BoxPlot” representam os coeficientes de assimetria da respectiva variável. (A) Distribuição de dados não transformados. (B) Distribuição após a transformação “Box-Cox” das variáveis com alta assimetria. Motilidade total (MT; %), Motilidade Progressiva (MP; %), velocidade curvilínea (VCL;  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade progressiva (VSL;  $\mu\text{m/s}$ ), velocidade média de trajeto (VAP;  $\mu\text{m/s}$ ), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH;  $\mu\text{m}$ ), batimento flagelar (BCF; Hz), linearidade (LIN; %), progressividade (STR; %).

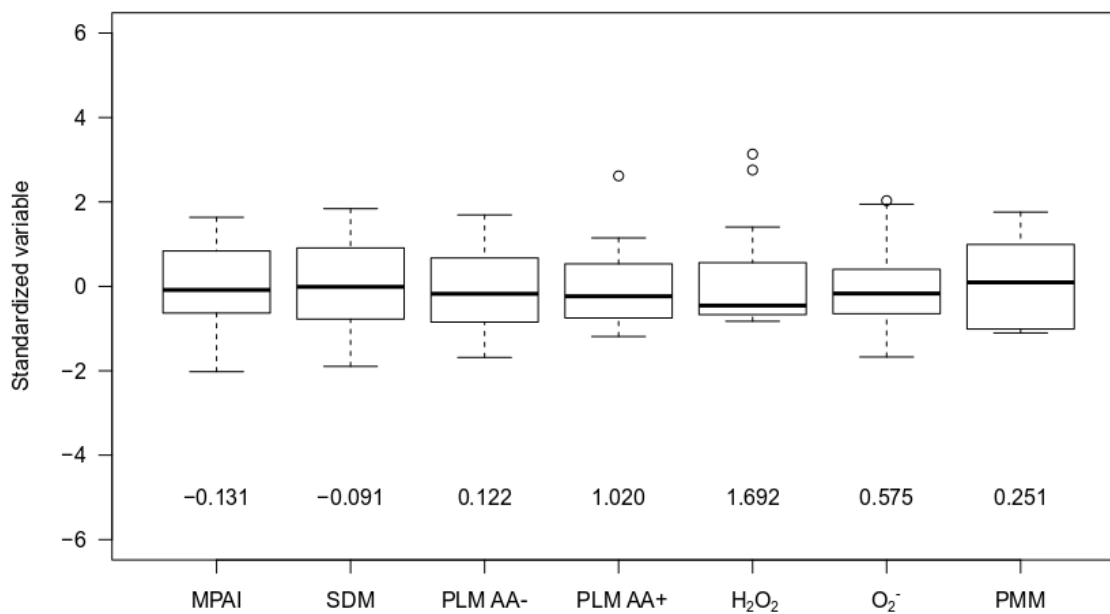


Figura Suplementar S2. Valores de coeficiente de assimetria de cada “Box Plot” para as variáveis espermáticas morfofuncionais, analisadas em citômetro de fluxo, apresentando distribuição normal. Membrana plasmática e acrossomal íntegra (MPAI; %), sem desestabilização de membrana plasmática (SDM; %), peroxidação lipídica da membrana sem AA (PLM AA-; UA), peroxidação lipídica da membrana com AA (PLM AA+; UA), produção de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; UA), produção de ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>; UA) e potencial de membrana mitocondrial (PMM; UA).

# *Capítulo 3*

*“Dar o melhor de nós, sem esperar nada em troca. Só pela alegria de fazer a nossa parte. Apenas guiados pela certeza de que amor gera amor.”*

*Padre Marcelo Rossi*

## 1.0 Considerações finais

1. A adição de Ge132 ao meio diluente de criopreservação de sêmen bovino não foi capaz de manter os maiores valores de motilidade total e progressiva dos espermatozoides pós-descongelamento, em comparação ao controle, porém, todos os grupos testados apresentaram valores referentes a amostras seminais de boa congelabilidade, indicando que o Ge132 possa ser promissor quando adicionado em amostras seminais de touros de congelabilidade questionável.

2. Nos grupos pré-incubados anteriormente a refrigeração e na presença do Ge132 foi observado provável efeito benéfico tanto da utilização do antioxidante quanto do tempo de equilíbrio prévio a refrigeração, uma vez que, esses grupos foram capazes de manter maiores valores de motilidade total mesmo após 60 minutos a 38° C, em comparação com os grupos imediatamente refrigerados na presença do Ge132.

3. Algumas características cinéticas, imprescindíveis para se atestar a fertilidade de uma amostra espermática, foram beneficiadas na presença do Ge132 e, de forma geral, não foi observado efeito deletério ou tóxico do antioxidante adicionado por não resultar em valores cinéticos abaixo do mínimo aceitável para caracterizar boa fertilidade espermática.

4. A suplementação do meio crioprotetor com Ge132, na menor dose utilizada, foi capaz de aumentar a porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática e acrossomol íntegra, bem como o número de espermatozoides sem desestabilização de membrana.

5. A ação antioxidante específica do Ge132 não ficou evidente no presente estudo, uma vez que, os níveis de produção dos radicais livres, assim como, o potencial de membrana mitocondrial, não mostraram diferenças evidentes as quais comprovassem essa ação, mas também, devemos levar em consideração a dificuldade na padronização em literatura sobre valores específicos para essas variáveis que justificassem uma ação antioxidante ou não, interferindo numa conclusão final.

6. A avaliação da peroxidação lipídica de membrana foi considerada a variável espermática que mais evidenciou possível poder benéfico do Ge132, demonstrando provável proteção sobre a membrana plasmática, mesmo após indução ao estresse oxidativo.