

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

USO DE ANTIOXIDANTES NO MEIO DILUENTE TRIS PARA
REFRIGERAÇÃO E CONGELAÇÃO DE CÉLULAS
ESPERMÁTICAS PROVENIENTES DE EPIDÍDIMO DE
CÃES SUBMETIDOS À ORQUIECTOMIA ELETIVA.

Paula Andressa Pennacchi Savi
Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
2012

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

USO DE ANTIOXIDANTES NO MEIO DILUENTE TRIS PARA
REFRIGERAÇÃO E CONGELAÇÃO DE CÉLULAS
ESPERMÁTICAS PROVENIENTES DE EPIDÍDIMO DE
CÃES SUBMETIDOS À ORQUIECTOMIA ELETIVA.

Paula Andressa Pennacchi Savi

Orientador: Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente

Coorientadoras: Prof. Dra. Juliana Corrêa Borges

Prof. Dra. Maria Isabel Mello Martins

Dissertação apresentada a Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia Veterinária.

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2012

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

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

Se não houver frutos...

Valeu a beleza das flores!

Se não houver flores...

Valeu a sombra das folhas!

Se não houver folhas...

Valeu a intenção da semente!

“Henfil”

Dedico a minha mãe e amiga!
Pelo apoio e caminhada lado a lado!
A conquista é nossa! Amo você!

Agradecimentos...

Primeiramente a DEUS, pela oportunidade da vida, e força a todo o momento, pela certeza que carregamos que nunca estamos sós.

Aos meus avós, Hermínio e Maria, que mesmo do outro lado, me amparam e fortalecem, saudades eternas.

À minha mãe, por sempre estar presente, acompanhando cada passo do meu crescimento pessoal e profissional, por ser amiga e inspiração, por me incentivar a ir em frente, e me estender a mão quando tudo parece perdido, por todo carinho e amor dedicado.

À minha irmã e amiga, Sara, pelas risadas e apoio sempre, pela ajuda a qualquer hora, pela amizade, cumplicidade, carinho e companheirismo único.

Ao meu pai, pelo apoio e amizade.

Ao companheiro, amigo e amor, Hugo, por todo carinho dedicado, pelas longas conversas, pelas risadas, por todo o apoio recebido.

Ao professor Wilter, “papis”, por todo incentivo a pesquisa, por se preocupar conosco, pelo cuidado e carinho com seus “filhos”.

À Ju, pelas horas de ajuda, no laboratório, análise dos dados, ou discussão! Pelos momentos incríveis, por esse coração nobre! Pela grande amizade adquirida!

À Bel, por me apresentar a reprodução, me incentivar na pesquisa, e compartilhar conhecimentos e amizade!

Ao professor Cocão, por 12 semanas, que mudam uma vida, pelas dicas e conhecimento compartilhado!

À professora Denise e suas orientadas do laboratório de reprodução de Botucatu, Bethânia, Camilla, Guta, por emprestarem o laboratório e ajudarem a fazer os meios diluidores e à Camilla pela hospitalidade e amizade!

Ao professor Marcelo da Uel, por ceder o laboratório de reprodução para leitura das DABs.

Aos queridos amigos de jornada! Posso mesmo dizer jornada, não é? Afinal só vocês mesmos para enfrentarem comigo 35 machos num único dia! Pelas risadas, bagunças, pelos momentos inesquecíveis e amizades eternas!

Às queridas Tathi e Lu, diria meu braço esquerdo e direito, confidentes, professoras, companheiras, loiras lindas, gigantes amigas!

Ao Giu, amigo e companheiro, pelos ensinamentos e noites no laboratório sempre divertidas!

À Eli, Ara e Maricy, por tudo que me ensinaram, e pela amizade dedicada!

Aos meninos, Caio, Diogo, Felipe, Marquinho e Ricardo, e as meninas Maria Emília, Raquel e Bia, Juliana, pela amizade e momentos compartilhada em todos esses anos!

À Allana e Aninha, pelo incrível período de descongelação, pela filmagem das palhetas explosivas, sustos compartilhados, pela amizade e carinho sempre!

À amiga de alma, que é o ó do borogodó, Mi, pelos finais de semana juntas no laboratório, escutando forró e a noite ganhando na imagem e ação!

À amiga Carol, por toda ajuda, ensinamentos, conversas, idas ao japonês, carinho e apoio nestes últimos anos!

Aos amigos de republica, a Mari, Sô, Lê, Super e André, pelos dias incríveis, companhia inesquecível e amizade. Pelos jantares maravilhosos, e aulas de culinária! Pelas risadas, tombos, conversas, confissões compartilhadas! Aos amigos Mari e André, por todas as correções e ajuda durante a elaboração da dissertação.

Às amigas de Londrina, Rê e Vivi, por todo o apoio, horas no telefone, carinho dedicado, conselhos e festas! Amizade não tem distância!

Às amigas homeopatas Mi, Rosana, Rocio e Roberta, pelas gotinhas dinamizadas e amizade em dose única!

A todos os amigos e do departamento de reprodução, em especial ao Edson, pelo café maravilhoso, cuidado e ajuda sempre. A Rô e o Ivo, pelas conversas comendo pipoca, pela ajuda na realização das soluções impossíveis e pelas mil e quinhentas dúvidas tiradas a todo momento. A Bel que me salva sempre em cima da hora com os relatórios e ofícios!

Aos amigos da obstetrícia, ao Arnildo pela ajuda com os animais, e a d. Isildinha, por deixar sempre o local limpo para nós.

Aos amigos Geninho e Matheus por realizarem todos os hemogramas dos animais.

Aos amigos da pós-graduação, Marcia, Diego, Rodrigo, Nina, e todos os outros, por toda ajuda e dúvidas tiradas, sempre na correria.

Ao professor Barbosa, ao Eduardo e Evandro, pela realização da estatística.

À Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo, pela concessão de bolsa e auxílio.

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Paulo e Prof. Aracelle, pela contribuição e correções a este estudo.

Por fim agradeço àqueles que escolhi dedicar horas de estudo! Aos amigos de quatro patas, por nos compreenderem e ensinarem a todo o momento, que lealdade é para sempre, mesmo após picadas e contenção. Pela gratidão, a cada atendimento!

Agradeço a todos, e aos que participaram e aqui não foram citados as minhas sinceras desculpas e o meu muito obrigada!

Amigo é coisa pra se guardar

Do lado esquerdo do peito...

Mesmo que o tempo e a distância digam não...

Mesmo esquecendo a canção...

O que importa é ouvir,

A voz que vem do coração...

Pois seja o que vier...

Venha o que vier...

Qualquer dia amigo a gente,

Vai se encontrar...

... minha eterna gratidão.

SUMÁRIO

	Páginas
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Epidídimo e Espermatozoides	3
2.2. Recuperação dos Espermatozoides do Epidídimo	5
2.3. Criopreservação dos Espermatozoides	6
2.4. Composição do Diluidor	7
2.5. Estresse Oxidativo	9
2.6. Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)	10
2.7. Antioxidantes	12
2.8. Antioxidantes x ROS x Espermatozoides	14
3. OBJETIVOS	16
3.1. Objetivo Geral	16
3.2. Objetivos Específicos	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1. Animais	17
4.2. Obtenção do Recuperado Espermático	17
4.3. Constituição das Unidades Experimentais	18
4.4. Grupos Experimentais	18
4.5. Refrigeração e Congelação	19
4.6. Meio Diluidor	20
4.7. Avaliação Espermática	21
4.7.1. Concentração Espermática	21
4.7.2. Morfologia Espermática	21

4.7.3. Motilidade Progressiva e Vigor Espermáticos	21
4.7.4. Teste Hiposmótico	22
4.7.5. Teste Supra Vital	23
4.7.6. Teste de Fluorescência	24
4.7.7. Teste de Atividade Citoquímica (Coloração DAB)	25
4.7.8. Mensuração da lipoperoxidação (OH ⁻)	27
4.7.9. Teste Termo Resistência (TTR) – Lento	27
4.8. Análise Estatística	27
5. RESULTADOS	29
5.1. Motilidade e Vigor	29
5.2. Avaliação da Integridade de Membrana	36
5.3. Teste Vital	41
5.4. Índice de Atividade Mitocondrial	43
5.5. Lipoperoxidação	45
5.6. Diferenças dos Parâmetros entre os Períodos de Processamento (Δ)	47
5.7. Correlações	53
6. DISCUSSÃO	54
7. CONCLUSÕES	59
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
ANEXOS	76

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Percentual das patologias espermáticas observadas nas unidades experimentais, classificadas em defeitos menores, maiores, e totais. Jaboticabal – 2012	29
Tabela 2: Percentual da motilidade das células espermáticas, recuperadas de epidídimo de cães, mediana (mínimo – máximo), comparando diferentes concentrações (0,5, 2,5, 5mMol) de vitamina E e/ou NAC adicionadas ao meio diluidor, avaliados a fresco, após período de refrigeração e após o processo de congelação/descongelação. Jaboticabal – 2012.	30
Tabela 3: Vigor das células espermáticas, recuperadas de epidídimo de cães, medianas (mínimo-máximo), comparando diferentes concentrações (0,5, 2,5, 5mMol) de vitamina E e/ou NAC adicionadas ao meio diluidor, avaliados a fresco, após período de refrigeração e após o processo de congelação/descongelação. Jaboticabal – 2012.	31
Tabela 4: Percentual da motilidade das células espermáticas, recuperadas de epidídimo de cães, após a realização do teste TTR, valores mediana (mínimo-máximo), comparando diferentes concentrações (0,5, 2,5, 5mMol) de vitamina E e/ou NAC adicionadas ao meio diluidor, avaliados a fresco, no período de refrigeração e após o processo de congelação/descongelação. Jaboticabal – 2012.	32
Tabela 5: Vigor das células espermáticas, recuperadas de epidídimo de cães, medianas (mínimo-máximo), comparando diferentes concentrações (0,5, 2,5, 5mMol) de vitamina E e/ou NAC adicionadas ao meio diluidor, após a realização do teste TTR, avaliados a fresco, no período de refrigeração e após o	

	processo de congelação/descongelação. Jaboticabal – 2012.	33
Tabela 6.	Percentual de células espermáticas com membranas íntegras, recuperadas de epidídimo de cães, médias $\pm$ desvio padrão, avaliadas pelo teste hiposmótico, comparando diferentes concentrações (0,5, 2,5, 5mMol) de vitamina E e/ou NAC adicionadas ao meio diluidor, avaliados a fresco, após período de refrigeração e após o processo de congelação /descongelação. Jaboticabal – 2012.	37
Tabela 7.	Percentual de células espermáticas com membranas íntegras, recuperadas de epidídimo de cães, valores médios $\pm$ desvio padrão, avaliadas pelo teste de fluorescência, comparando diferentes concentrações (0,5, 2,5, 5mMol) de vitamina E e/ou NAC adicionadas ao meio diluidor, avaliados a fresco, após período de refrigeração e após o processo de congelação /descongelação.	38
Tabela 8.	Percentual das células espermáticas vivas, recuperadas de epidídimo de cães, valores médios $\pm$ desvio padrão, avaliadas pela coloração eosina amarela, comparando diferentes concentrações (0,5, 2,5, 5mMol) de vitamina E e/ou NAC adicionadas ao meio diluidor, avaliados a fresco, após período de refrigeração e após o processo de congelação /descongelação. Jaboticabal – 2012.	41
Tabela 9.	Índice da atividade mitocondrial das células espermáticas recuperadas de epidídimo de cães, medianas (mínimo-máximo), avaliadas pela coloração de DAB, comparando diferentes concentrações (0,5, 2,5, 5mMol) de vitamina E e/ou NAC adicionadas ao meio diluidor, avaliados a fresco, após período de refrigeração e após o processo de congelação /descongelação. Jaboticabal – 2012.	43
Tabela 10.	Mensuração da lipoperoxidação (Tbars), em 40×10^6	

espermatozoides, medianas (mínimo-máximo), em relação à concentração (0,5, 2,5, 5,0 mMol) de vitamina E e/ou NAC adicionadas ao meio diluidor. Jaboticabal – 2012.

45

Tabela 11. Variação da motilidade progressiva entre os períodos de processamento de armazenamento das células espermáticas, recuperadas de epidídimo de cães, valores médios $\pm$ desvio padrão, comparando diferentes concentrações (0,5, 2,5, 5mMol) de antioxidantes adicionados ao meio diluidor. Jaboticabal – 2012.

48

Tabela 12. Variação das células espermáticas, oriundas de epidídimo canino, vivas, observadas no teste hiposmótico, entre os períodos de processamento, valores médios $\pm$ desvio padrão, comparando diferentes concentrações (0,5, 2,5, 5mMol) de antioxidantes adicionados ao meio diluidor. Jaboticabal – 2012.

49

Tabela 13. Variação das células espermáticas, oriundas de epidídimo canino, vivas, observadas na coloração fluorescência, entre os períodos de processamento, valores médios $\pm$ desvio padrão, comparando diferentes concentrações (0,5, 2,5, 5mMol) de antioxidantes adicionados ao meio diluidor. Jaboticabal – 2012.

50

Tabela 14. Variação das células espermáticas, oriundas de epidídimo canino, vivas, observadas na coloração eosina amarela, entre os períodos de processamento, valores médios $\pm$ desvio padrão, comparando diferentes concentrações (0,5, 2,5, 5mMol) de antioxidantes adicionados ao meio diluidor. Jaboticabal – 2012.

51

Tabela 15. Variação do índice de atividade mitocondrial, realizado pela coloração de DAB, entre os tempos de armazenamento das células espermáticas, recuperadas de epidídimo de cães, valores médios $\pm$ desvio padrão, comparando diferentes concentrações (0,5, 2,5, 5mMol) de antioxidantes adicionados

ao meio diluidor. Jaboticabal – 2012.	52
Tabela 16. Correlação entre os testes desenvolvidos para análise das células espermáticas oriundas de epidídimo canino. Jaboticabal – 2012.	53

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Diagrama da divisão das 15 unidades experimentais (UEs), nos grupos experimentais (GE), e suas subdivisões, com adição de 5, 2,5 e 0,5mMol de antioxidantes.	19
Figura 2: Fluxograma do delineamento experimental.	20
Figura 3: Fotomicrografia de células espermáticas oriundas de epidídimo canino, 1. reativo ao teste hiposmótico, com membrana plasmática íntegra; 2. com membrana plasmática lesada, em microscópio com contraste de fases, em aumento de 400x.	22
Figura 4: Fotomicrografia de células espermáticas oriundas de epidídimo canino, células espermáticas brancas, classificadas como vivas e rosas como mortas, segundo teste supra vital, utilizando o corante eosina amarela, observado em microscópio óptico, em aumento de 100x.	23
Figura 5: Fotomicrografia de células espermáticas oriundas de epidídimo canino, célula espermática vermelha, com membrana plasmática lesada e verde com membrana plasmática íntegra, pelo teste de fluorescência, observada em microscópio de fluorescência, em aumento de 1000X.	25
Figura 6: Fotomicrografia de células espermáticas oriundas de epidídimo canino, submetidas à coloração de DAB. Classificação da atividade mitocondrial dos espermatozoides, onde em 1. quase todas as mitocôndrias são ativas, em 2. segmentos ativos e inativos com predominância dos ativos, em 3. menos da metade da bainha mitocondrial ativa e com poucas mitocôndrias ativas dispersas e em 4. mitocôndrias completamente inativos, observados em microscópio com contraste de fases no aumento de 1000X.	26

- Figura 7:** Representação gráfica da motilidade progressiva das células espermáticas recuperadas do epidídimo de cães, comparando as diferentes concentrações (0,5, 2,5 e 5mMol) de antioxidantes adicionados ao meio diluente TRIS, avaliadas a fresco, após 48 horas de refrigeração e após descongelação. 34
- Figura 8:** Representação gráfica do vigor das células espermáticas recuperadas do epidídimo de cães, comparando as diferentes concentrações (0,5, 2,5 e 5mMol) de antioxidantes adicionados ao meio diluente TRIS, avaliadas a fresco, após 48 horas de refrigeração e após descongelação. 35
- Figura 9:** Representação gráfica do percentual das células espermáticas recuperadas de epidídimo canino, com membrana plasmática íntegra, avaliadas pelo teste hiposmótico, comparando as diferentes concentrações (0,5, 2,5 e 5mMol) de antioxidantes adicionados ao meio diluente TRIS, avaliadas a fresco, após 48 horas de refrigeração e após descongelação. 49
- Figura 10:** Representação gráfica do percentual das células espermáticas recuperadas de epidídimo canino, com membrana plasmática íntegra, avaliadas pela coloração fluorescente, comparando as diferentes concentrações (0,5, 2,5 e 5mMol) de antioxidantes adicionados ao meio diluente TRIS, avaliadas a fresco, após 48 horas de refrigeração e após descongelação. 40
- Figura 11:** Representação gráfica do percentual das células espermáticas vivas recuperadas de epidídimo canino, avaliadas pela coloração eosina amarela, comparando as diferentes concentrações (0,5, 2,5 e 5mMol) de antioxidantes adicionados ao meio diluente TRIS, avaliadas a fresco, após 48 horas de refrigeração e após descongelação. 42
- Figura 12:** Representação gráfica do índice de atividade mitocondrial das células espermáticas recuperadas de epidídimo canino,

comparando as diferentes concentrações (0,5, 2,5 e 5 mMol) de antioxidantes adicionados ao meio diluente TRIS, avaliadas a fresco, após 48 horas de refrigeração e após descongelação.

44

Figura 13: Representação gráfica da média da produção de radicais livres das células espermáticas recuperadas de epidídimo canino, comparando as diferentes concentrações (0,5, 2,5 e 5 mMol) de antioxidantes adicionados ao meio diluente TRIS, avaliadas a fresco, após 48 horas de refrigeração e após descongelação.

46

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
μL	Microlitros
AGPI	Ácidos Graxos Poliinsaturados
GE	Grupo Experimental
H_2O	Água
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
$\text{L}^\cdot$	Radical Lipídico
$\text{LOO}^\cdot$	Radical Peroxil
MDA	Malonaldeído
NAC	N-acetilcisteína
NV	Associação da N-acetilcisteína, com a Vitamina E
O_2	Oxigênio
$\text{O}_2^\cdot$	Superóxido
$\text{OH}^\cdot$	Radical Hidroxila
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
TBARS	Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TTR	Teste de Termo Resistência
UEs	Unidades Experimentais
VE	Vitamina E

USO DE ANTIOXIDANTES NO MEIO DILUENTE TRIS PARA REFRIGERAÇÃO E CONGELAÇÃO DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS PROVENIENTES DE EPIDÍDIMO DE CÃES SUBMETIDOS À ORQUIECTOMIA ELETIVA.

RESUMO – O objetivo foi testar se a suplementação do meio diluente com dois antioxidantes (N-acetilcisteína e/ou vitamina E), em diferentes concentrações, melhorou a qualidade da preservação das células espermáticas provenientes de epidídimo de cães, nos processos de refrigeração e congelação. Utilizaram-se 15 unidades experimentais (UE), cada uma, constituída pelo recuperado espermático de cinco cães hígdos, submetidos à orquiectomia eletiva; as quais foram divididas em três grupos experimentais (GI, GII, GIII), constituídos por cinco UE cada. Adicionou-se antioxidantes nas concentrações de 5,0; 2,5 e 0,5mMol, respectivamente. Cada grupo foi dividido em três alíquotas, uma avaliada a fresco, outra refrigerada por 48 horas e a terceira congelada. Ato contínuo, cada UE foi dividida em quatro alíquotas de igual volume e estas centrifugadas; o concentrado de espermatozoides foi ressuscitado em meio diluente TRIS, acrescido de vitamina E e/ou N-acetil-cisteína. Realizou-se a avaliação dos espermatozoides, quanto à motilidade, vigor, teste vital e morfologia espermática. A integridade de membrana foi avaliada por meio do teste hiposmótico e coloração por sondas fluorescentes, e a atividade mitocondrial pela atividade citoquímica (DAB). Os dados obtidos foram submetidos à análise não paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis e Friedman, e os paramétricos pelo Tukey ($p < 0,05$). Observou-se significância entre os grupos GI, GII e GIII, sendo que o GIII apresentou melhores resultados ($p < 0,05$). Não foi observada diferença entre os tratamentos do GII ($p > 0,05$), em relação aos do GI, ressaltou-se a suplementação da NAC isolada ou associada à vitamina E possuindo efeito deletério na preservação das células espermáticas ($p < 0,05$), e aos do GIII, a suplementação do meio diluente com antioxidantes, manteve a atividade mitocondrial superior em relação ao grupo controle após a descongelação ($p < 0,05$). Concluiu-se, que apesar da similitude ao grupo controle, a pequena concentração de antioxidante apresentou melhores resultados.

Palavras chaves: epidídimo, cão, radicais livres, vitamina E, n-acetilcisteína.

USE OF ANTIOXIDANTS IN TRIS EXTENDER DURING CHILING AND FREEZINDG OF DOGS EPIDIDIMAL SPERM CELLS.

ABSTRACT: The aim of the present study was to evaluate whether the supplementation of the extender media with two different antioxidants, using them separately or associated and in different concentrations, improved or not the quality of sperm cells after cooling and freezing. Fifteen experimental units (EU), each one consisted by epididymal sperm recovered from five healthy dogs (total of 75 animals) that underwent to elective orchiectomy were assessed. The EU were equally divided into three experimental groups. Group I (GI) and II (GII), III (GIII) had the addition of 5; 2.5; or 0.5 of antioxidants. Each group was divided into three aliquots, the first one was evaluated at the moment of the collection, the second aliquot was chilled for 48 h and the third was frozen. Subsequently, each EU was divided into four aliquots of equal volume and immediately centrifuged, the supernatant was discarded and the concentrated sperm resuspended in TRIS extender supplemented with Vitamin E and/or N-acetyl-cysteine. Sperm total and progressive motility, and vital test were performed.. Additionally, membrane integrity was assessed using the hyposmotic swelling test and fluorescent staining. Nevertheless, mitochondrial activity was performed by cytochemical activity test (DAB). The data were statistically analyzed using nonparametric Kruskal-Wallis and Friedman and parametric Tukey ($p < 0.05$). Except for 5 mMol of NAC or NAC + Vitamin E that were harmful for the sperm cells, there was no significance among the experimental groups. However, when comparing the different antioxidant concentrations of the same chemical significance variation was noticed and 0.5 mMol of NAC and/or Vit E promoted more benefits to the spermatic cells when compared to the other concentrations, and when added to the extender, 0,5 mMol of antioxidants, the index of mitochondrial activity after the thawing process was kept higher than the control group. It can be concluded that despite the similarity to the control group, the small concentration of antioxidant shows better results.

Key Words: epididymis, dog, free radicals, vitamin E, n-acetylcysteine.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, o desenvolvimento de biotecnologias, como refrigeração e congelamento do recuperado espermático de epidídimo, tem por finalidade o resgate de material genético de animais submetidos à orquiectomia ou que vieram a óbito recentemente. Sendo que, o cão tem sido considerado melhor modelo experimental para estudos da fisiologia e função reprodutiva de canídeos selvagens.

A formação das espécies reativas de oxigênio (ROS) *in vivo*, auxiliam o processo de capacitação espermática e fecundação, no entanto o excesso desses radicais é prejudicial às células espermáticas, lesionando-as e ocasionando a queda da motilidade, vigor e até a morte. Destarte para manter um equilíbrio, as glândulas acessórias do trato reprodutor masculino e a própria célula espermática produzem antioxidantes naturais, todavia durante o processo de criopreservação o estresse oxidativo, ocasiona um desequilíbrio entre produção e neutralização dos radicais livres.

Sendo assim, estudos utilizando antioxidantes ao meio de refrigeração e congelamento de sêmen de diferentes espécies, evidenciaram efeitos benéficos frente à ação das ROS (BILODEAU et al., 2001, THUWANUT et al., 2008, MICHAEL et al., 2009). MICHAEL et al. (2009), demonstraram que a suplementação, do meio diluente de sêmen canino, com 0,5mM de N-acetil-cisteína ou 0,1mM de vitamina E ou ainda com 0,1mM de vitamina B16, promoveu benefícios durante a refrigeração (por 72 horas) das células espermáticas obtidas do ejaculado canino, enquanto que a adição de 0,5mM de vitamina C não teve resultados significativos. Entretanto, para espermatozoides oriundos do epidídimo de gatos foi necessária a suplementação com uma quantidade maior de antioxidante quando comparado ao estudo anterior, 5mM de N-acetil-cisteína ou 5mM de vitamina E, ao meio diluidor para obtenção de resultados positivos. (THUWANUT et al., 2008).

Os referidos autores demonstraram a eficácia da N-acetil-cisteína e da vitamina E quando comparadas com os demais antioxidantes. No entanto não foram

encontrados na literatura disponível, relatos da adição de antioxidantes ao meio diluidor durante a criopreservação de células espermáticas oriundas de epidídimo canino.

Deste modo o presente estudo teve como intuito verificar se o uso destes protetores contra radicais livres em diferentes concentrações, em separado ou associados produz benefícios durante a criopreservação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

No mundo atual os cães representam um papel importante perante a sociedade. Além de ser uma espécie de estimação e companhia, vem sendo utilizado como um dos principais modelos experimentais nas pesquisas conduzidas na área da medicina, e tem sido valioso para estudos básicos de fisiologia e função reprodutiva aplicadas à população de canídeos selvagens ameaçados de extinção (SOUZA, 2003).

De acordo com a “Internacional Union for Conservation of Nature” (IUCN, 2008) são 36 espécies que compõe a família *Canidae*, sendo que nove delas correm risco de extinção, e duas pertencem à fauna selvagem brasileira, como é o caso do cachorro vinagre (*Speothos venaticus*) e do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*).

Devido às muitas espécies ameaçadas de extinção, biotécnicas de reprodução vem sendo estudadas para preservação de gametas (FARSTAD, 2000, HORI et al., 2005^a). Comumente a coleta de sêmen nessas espécies é feita por eletro-ejaculação, no entanto quando os animais morrem acidentalmente, os espermatozoides são recuperados da cauda do epidídimo (HORI et al., 2005^a; HORI et al., 2005^b). Assim, como a criação canina, tem experimentado um aumento dos pedidos de criopreservação de amostras com alto valor zootécnico, tem sido observado uma maior demanda de pesquisas nesta área (FARSTAD, 2000; PEÑA et al., 2006).

2.1. Epidídimo e Espermatozoides

O uso de espermatozoides recuperados de epidídimo vem sendo estudados em diversas espécies; gatos (KASHIWAZAKI et al., 2005), cães (YU E LEIBO, 2002; SAVI et al., 2008), cervídeos (HISHINUMA et al., 2003; FERNANDEZ-SANTOS et al., 2007), porcos (IKEDA et al., 2002), carneiros (KAABI et al., 2003) e touros (FOOTE, 2000), com o intuito de recuperar o material genético de animais que vieram a óbito e naqueles

de alto valor zootécnico submetidos à orquiectomia. Estas células, são morfologicamente viáveis e retêm a capacidade de sofrer reação de capacitação e ligar-se à zona pelúcida (LUVONI et al., 2003; TSUTSUI et al., 2003).

O epidídimo é dividido em três partes; cabeça, corpo e cauda. Caracteriza-se por apresentar dois tipos principais de células, as células principais que apresentam na sua superfície luminal microvilosidades, e as células basais. A cabeça do epidídimo está envolvida com a reabsorção, o corpo com a maturação espermática, e a cauda com o armazenamento de espermatozoides férteis. (AMANN, 1986).

A maturação dos espermatozoides durante a passagem pelo epidídimo de mamíferos consiste em mudanças, tal como a migração da gota citoplasmática de uma posição proximal para distal (CRABO et al., 1975). As mudanças bioquímicas incluem a formação de pontes dissulfeto dentro a cauda do espermatozoide e do núcleo (SANOCA E KURPISZ, 2004). Os microtubulos e as estruturas fibrosas são importantes para a motilidade espermática porque constituem os pares do axonema, das fibras densas e do revestimento fibroso das peças intermediária e terminal. Por outro lado, as estruturas membranosas são mais importantes sob a perspectiva do choque térmico e do estresse oxidativo (BORGES, 2008). Devido à estas apresentarem em sua formação grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) que proporciona maior fluidez (AGARWAL et al., 2003), estes quando submetidos ao estresse térmico, assumem uma forma cônica, com parte hidrofóbicas e hidrofílica, externa e internamente, respectivamente (WATSON, 1995).

A capacidade, dos espermatozoides recuperados de epidídimo, de se ligar a zona pelúcida, foi mantida mesmo após um período de 192 horas (oito dias) de resfriamento à 4°C (YU E LEIBO, 2002), e após a descongelação (MARTINS et al., 2009). A viabilidade espermática também foi observada após descongelar espermatozoides oriundos da cauda de epidídimo previamente refrigerados à 5°C por quatro dias (PONGLOWHAPAN et al., 2006).

Os espermatozoides provenientes de ejaculado, são expostos ao plasma seminal, sendo este uma importante fonte de substâncias antioxidantes (SIKKA, 2001; JELEZARSKY, 2008), assim, acredita-se que espermatozoides recuperados de

epidídimo possuem baixo mecanismo de defesa antioxidante, por não estarem expostos ao plasma. Além disso, durante a coleta do epidídimo, os espermatozoides são geralmente contaminados com outras células do epidídimo que poderia contribuir para lipoperoxidação (THUWANUT et al., 2008).

2.2. Recuperação dos Espermatozoides do Epidídimo

Muitos métodos de recuperação das células espermáticas do epidídimo são descritos e variam dependendo do autor e da espécie do animal, a coleta dos espermatozoides tem sido relatada em inúmeras espécies, como suínos (KIKUCHI et al., 1998), caprinos (MARTINEZ-PASTOR et al., 2005), cervídeos (FERNANDEZ-SANTOS et al., 2009), felinos (GAÑÁN et al., 2009), caninos (SAVI et al., 2008), equinos (HEISE et al., 2011) e bovinos (MARTINS et al., 2009).

Nos casos dos pequenos animais, muitos métodos têm sido descritos. A flutuação consiste em cortar a cauda do epidídimo e deixar esta repousar em um meio gelatinoso, desta maneira, os espermatozoides migram para o meio e são recuperados através de filtração (YU e LEIBO, 2002). De outro modo, cortes também são realizados na cauda do epidídimo e este é suavemente pressionado, assim os espermatozoides são coletados por extravasamento (KAABI et al., 2003). Do mesmo modo esta técnica é realizada, porém a cauda do epidídimo é perfurada com agulha (BARTELS et al., 2000).

Pinças hemostáticas (KISHIKAWA et al., 1999; MARTINS et al., 2003; SAVI et al., 2008), ou um compressor metálico (WAHEED et al., 2011) são utilizadas para compressão do epidídimo e ducto deferente e assim recuperar os espermatozoides. Um fluxo retrógado pode ser promovido aplicando pressão no ducto deferente até que o conteúdo saia através de uma incisão feita na junção da cauda com o corpo do epidídimo (GARDE et al., 1994).

2.3. Criopreservação dos Espermatozoides

A criopreservação tem como princípio a utilização de baixas temperaturas como uma estratégia para diminuição do gasto de energia resultando na preservação de forma eficiente da estrutura e função de células e tecidos vivos (BAUST, 2008). Este processo permite hoje um armazenamento de espermatozoides caninos de raças raras, geneticamente valiosas, ou com doenças hereditárias, ou ainda de canídeos em extinção (ENGLAND, 1993; FARSTAD, 2000).

A utilização de sêmen refrigerado ou descongelado durante o processo de inseminação artificial, elimina custos, tempo e os riscos de transporte dos animais. Além de evitar a incidência de doenças transmissíveis pelo coito, permite a utilização do sêmen de reprodutores geneticamente superiores, tanto em âmbito nacional como internacional (ENGLAND E PONZIO, 1996).

A refrigeração dos espermatozoides propicia redução do metabolismo espermático, que por sua vez, prolonga a viabilidade destes. Para prevenir ou minimizar as alterações na membrana do espermatozoide que podem ocorrer durante a refrigeração celular, este processo deve ser realizado de maneira controlada e em meios diluentes específicos (CUNHA, 2002). Em cães, YU E LEIBO (2002) demonstraram que não houve alterações significativas quanto à integridade das membranas plasmática e acrossomal de espermatozoides recuperados do epidídimo, quando armazenados a 4°C durante 48 horas. Já a motilidade espermática diminuiu abruptamente nas primeiras cinco horas de refrigeração e após este período apresentou decréscimo gradual. Não obstante, espermatozoides recuperados do epidídimo canino apresentaram motilidade e capacidade de fertilização do oócito, mesmo após armazenamento durante oito dias a 4°C.

O mínimo indicado para a congelação das células espermáticas é de 70% de motilidade e qualidade de movimento três. O meio de diluição deve possuir componentes e crioprotetores que promovam proteção as células espermáticas, o processo de criopreservação deve apresentar curva de refrigeração,

congelamento/descongelamento; e armazenamento adequado, que juntos ocasionam menor perda da viabilidade das células espermáticas (JOHNSTON et al., 2001).

Apesar das vantagens da criopreservação do sêmen, esta biotécnica possui problemas (SALAMON E MAXWELL, 1995), devido as crio injúrias ocorridas durante os processos de congelamento e descongelamento (HOLT, 2000), que promovem a redução da motilidade e da integridade morfológica dos espermatozoides (WATSON, 2000) e, consequentemente, afetam a fertilidade (HOLT, 2000). Entre as crio injúrias está a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS).

Este estresse oxidativo acaba causando danos estruturais e biomoleculares à componentes celulares (HALLIWELL, 1991), este pode ser aumentado em espermatozoides do epidídimo, uma vez que não são expostos às secreções das glândulas sexuais acessórias (plasma seminal), que são reconhecidos como fonte de proteção antioxidante para os espermatozoides (CHEN et al., 2003).

2.4. Composição do Diluidor

Estudos tem sido realizados na tentativa de desenvolver um meio diluidor, que mantenha a qualidade dos espermatozoides durante o processo de criopreservação. O diluidor ideal deve atender a todas as necessidades das células espermáticas, como preservar a motilidade e a integridade da membrana plasmática, estabilizar o pH, neutralizar produtos tóxicos produzidos, proteger contra o choque térmico, manter o equilíbrio eletrolítico e pressão osmótica; atuar como fonte energética, estabilizar sistemas enzimáticos, e inibir o crescimento bacteriano (ENGLAND, 1993).

O balanço iônico e pH, que deve estar entre 6,8 e 7,2, é mantido através de solução tampão, onde mais comumente é utilizado o TRIS (tris-hidroximetil aminometano). Este atua removendo os íons de hidrogênio resultantes do metabolismo espermático. Enquanto que o citrato de sódio, age como quelante dos metais pesados existentes no líquido seminal (JOHNSTON et al., 2001).

Os espermatozoides necessitam de energia para manter a motilidade e atividade normal, esta pode ser obtida por fosforilação oxidativa mitocondrial ou por glicólise (VOLPE et al., 2009). Com esse intuito, adiciona-se como fonte de energia açúcares como: glicose, frutose, lactose ou manose ao diluidor. A glicose e frutose são as mais freqüentemente adicionados aos diluidores para conservação de sêmen de cão (PONGLOWHAPAN et al., 2006). RIGAU et al. (2001), demonstraram que espermatozoides incubados num meio enriquecido com frutose apresentaram um padrão de motilidade mais rápido e linear, comparativamente aos incubados em glicose.

A gema de ovo previne a perda ou substitui fosfolipídios da membrana plasmática (VERSTEGEN et al., 2005), confere proteção contra alterações da pressão osmótica (WITTE et al., 2009) e tem efeito protetor contra a reação espontânea do acrossoma das células espermáticas (IGUER-OUADA E VERSTEGEN, 2001).

Várias pesquisas têm concluído que a adição de detergentes ao diluidor com gema de ovo melhora a motilidade, a integridade acrossomal, a sobrevivência e a fertilidade das células espermáticas após a congelação (MAIA, 2006).

Os crioprotetores são substâncias capazes de promover a sobrevivência celular durante a refrigeração, congelação e descongelação; e são classificados por atuarem intra e extracelularmente (AMANN, 1986) e na estabilização da membrana. O mais utilizado para sêmen de cão é o glicerol (JOHNSTON et al., 2001).

Os antibióticos também são adicionados ao meio diluidor com função antimicrobiano, a associação mais frequentemente utilizada são a de sódio-enzilpenicilina e sulfato de dihidroestreptomicina (ABE et al., 2008; BECCAGLIA et al., 2008). A gentamicina, e a amicacina são outros antibióticos que também podem ser adicionados aos diluidores (JOHNSTON et al., 2001, MARTINS, 2005).

A suplementação dos diluidores com antioxidantes tem intuito de reduzir o impacto do estresse oxidativo durante o processo de conservação do sêmen, conservando a qualidade deste durante a criopreservação (MONTEIRO et al., 2009). No entanto, as concentrações, tipos e combinações de antioxidantes, são ainda

controversas, necessitando assim da realização de maiores estudos (BECCAGLIA et al., 2008).

2.5. Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo ocorre quando a produção espécies reativas de oxigênio (ROS) potencialmente destrutivas excede as defesas dos antioxidantes naturais do próprio corpo, resultando em danos celulares, refletindo na diminuição da motilidade e fluidez da membrana, integridade do DNA, função mitocondrial e alteração de metabolismo dos espermatozoides (AGARWAL et al., 2003; SILVA 2006). Trabalhos tem demonstrando que metade dos homens inférteis, sofrem com estresse oxidativo (TREMELLEN, 2008; AGARWAL et al., 2008).

A capacidade do estresse oxidativo de romper as membranas espermáticas foi primeiro relatada em 1943 por MacLeod quando ele reconheceu o impacto negativo de altas concentrações de oxigênio na motilidade espermática (Revisado por AITKEN et al., 1998). Isto se deve devido ao conteúdo do citoplasma ser menor, limitando assim a quantidade disponível de enzimas antioxidantes (VERNET et al., 2004). Além disso, a abundância de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) nas membranas dos espermatozoides, responsável pela fluidez para exercer a fusão de membranas, durante a fecundação, (PARKS E HAMMERSTEDT, 1985; LENZI et al., 2000; AGARWAL et al., 2003), torna os espermatozoides mais vulneráveis.

As ROS interferem, as ligações duplas (insaturações), enfraquecendo a ligação carbono-hidrogênio sobre o átomo de hidrogênio adjacente, tornando-o suscetíveis à clivagem (VERNET et al., 2004). A oxidação de lipídios é um exemplo típico de reação envolvendo radicais livres, e a velocidade da reação de oxidação depende do grau de insaturação na molécula do ácido graxo, assim, quanto maior o grau de insaturação, maior será a suscetibilidade à oxidação (BORGES, 2008).

Outro fator que contribui com a peroxidação lipídica de espermatozoides do epidídimo é a presença de gota citoplasmática, que são encontradas com abundância em espermatozoides recuperados de epidídimo (GOOVAERTS et al., 2006). Em humanos foi observado, que a presença desse defeito menor contribui para um aumento da produção de ROS (SAID et al., 2005).

A susceptibilidade dos espermatozoides ao dano oxidativo surge como um importante problema, pois pode levar à perda da motilidade, integridade da membrana, capacidade de fertilização e outras mudanças fisiológicas nos espermatozoides (AITKEN E BAKER 2004; CASSANI et al., 2005). No entanto, este não pode ser considerado apenas como um fator negativo para a espermatogênese; o estresse oxidativo também é necessário para vários processos fisiológicos específicos dos espermatozoides, como a capacitação e a reação acrossômica durante a fusão das membranas na fertilização (GRIVEAU E LANNOU, 1997).

2.6. Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

O termo radical livre refere-se ao átomo ou molécula altamente reativo, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica, (HALLIWELL, 1992). As camadas eletrônicas de um elemento químico são denominadas K, L, M e N, e seus subníveis, s, p, d, f. É o não-emparelhamento de elétrons da última camada que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas. Os radicais livres são formados em um cenário de reações de óxido-redução, isto é, ou cedem o elétron solitário, oxidando-se, ou recebem outro, reduzindo-se (FERREIRA E MATSURA, 1997).

Os radicais livres podem ser formados pela ação direta de alguma fonte de energia externa (luz, calor e radiação), ou interna, próprio metabolismo (subprodutos da respiração celular), por reações catalisadas pelos metais (ferro e cobre) ou por enzimas (BORGES, 2008).

As espécies reativas de oxigênio são encontradas em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o oxigênio (O_2) sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água (H_2O). Durante esse processo são formadas moléculas intermediárias reativas, como os radicais superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH^-), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Normalmente, a redução completa do O_2 ocorre na mitocôndria (COHEN, 1989).

O radical superóxido (O_2^-) é formado após a primeira redução do O_2 . Sua formação ocorre espontaneamente, especialmente, na membrana mitocondrial através da cadeia respiratória. Apesar de ser considerado pouco reativo em soluções aquosas, tem sido observada lesão biológica secundária (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1990).

O Radical hidroxila (OH^-) é considerado a ROS mais reativa em sistemas biológicos. É formado a partir do peróxido de hidrogênio em uma reação catalisada por íons metais (Fe^{++} ou Cu^{++}), denominada de reação de Fenton. A combinação extremamente rápida do OH^- com metais ou outros radicais no próprio sítio onde foi produzido confirma sua alta reatividade. O radical hidroxila pode inativar várias proteínas, ao oxidar seus grupos sulfidrilas ($-SH$) e as pontes dissulfeto ($-SS$). Também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1990).

O Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) apesar de não ser um radical livre, pois não possui elétrons desemparelhados na última camada, é um metabólito do oxigênio extremamente deletério, pois participa da reação que produz o OH^- . O H_2O_2 tem vida longa, e é capaz de atravessar camadas lipídicas (SCOTT et al., 1991).

Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ROS, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da lipoperoxidação, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade destas (MELLO FILHO et al., 1983). Consequentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos, e formação de produtos citotóxicos, como o malonaldeído (MDA) (HERSHKO, 1989), alta concentração de MDA compromete a motilidade espermática, a sua capacidade de sofrer reação acrossômica e ainda causa alterações no formato da célula (SHARMA E AGARWAL, 1996).

A degradação da estrutura da membrana plasmática provocada pelas ROS constitui o processo de lipoperoxidação. Esta é composta basicamente por três etapas:

1. Iniciação: as ROS ($\text{OH}^\cdot$) sequestram o hidrogênio ácidos graxos poliinsaturados presentes na membrana celular, com consequente formação dos radicais lipídico ($\text{L}^\cdot$).
2. Propagação: o radical lipídico reage rapidamente com o O_2 , resultando no radical peróxido ($\text{LOO}^\cdot$), que por sua vez sequestra novo hidrogênio da PUFA, formando novamente o radical lipídico.
3. Terminação: toda membrana se encontra lesada, pois os radicais ($\text{L}^\cdot$ e $\text{LOO}^\cdot$) produzidos propagam-se até destruírem a si próprios (FERREIRA E MATSUBARA, 1997).

O ROS são geradas pelo metabolismo de espermatozoides morfologicamente normais e anormais, bem como espermatozoides imaturos durante o armazenamento em condições aeróbicas (AGARWAL et al., 2003; SILVA, 2006). A reação de peroxidação lipídica é considerada uma das mais importantes causas de redução da fecundidade reprodutiva em mamíferos (AGARWAL et al., 2003). Estas podem causar infertilidade por dois mecanismos. No primeiro, causam danos a membrana espermática, que por sua vez reduz a motilidade progressiva do espermatozoide e a sua capacidade de fusão com o ócito. Já no segundo, estes radicais lesionam diretamente o DNA espermático, comprometendo o genoma paterno do embrião (TREEMELLEN, 2008).

2.7. Antioxidantes

Os antioxidantes são moléculas ou substâncias capazes de converter as ROS em água, com a finalidade de prevenir a sua super população (AGARWAL et al., 2005). Uma vasta gama de antioxidantes tem sido utilizados para bloquear ou impedir o

estresse oxidativo em uma variedade de sistemas celulares, pois impedem a propagação da peroxidação lipídica das membranas celulares (UPRETI et al., 1998).

Os mecanismos de defesa antioxidante presentes no plasma seminal e na célula espermática incluem sistemas enzimáticos e não enzimáticos. O sistema enzimático compreende enzimas como a superóxido dismutase, a glutathione redutase, glutathione peroxidase e catalase.(BORGES, 2008); e os antioxidantes não enzimáticos incluem o ácido ascórbico, a vitamina E, a taurina, a hipotaurina, os carotenóides e ubiquinonas (Coenzima Q), ácido úrico e ácido lipóico (NORBERG e ARNÉR, 2001). Para Ferreira e Matsubara, (1997) esses sistemas podem atuar em duas direções: como removedor do agente oxidante antes que ele ocasione lesão celular (superóxido dismutase; catalase; glutathione peroxidase e a vitamina E), ou ainda como agente reparador da lesão já ocorrida (ácido ascórbico; glutathione redutase e glutathione peroxidase).

A N-acetilcisteína (NAC), antioxidante com base tiol, desempenha um papel importante na proteção dos constituintes celulares contra dano oxidativo. A ação hipotética de NAC origina de sua capacidade de estimular e sustentar os níveis intracelulares de glutathione. Outra vantagem da NAC é a sua eficiência de quelar metais tóxicos (BANNER et al., 1986).

A vitamina E protege as células das ROS, *in vivo* e *in vitro*, e acredita-se que ela é o inibidor primário de radicais livres encontrados em pequenas quantidades nas membranas celulares e no plasma seminal de mamíferos (SIKKA, 2004).

Várias formas de vitamina E têm sido utilizadas em estudos de preservação de espermatozoides. Adição de vitamina E (atocopherol) manteve a integridade da membrana espermática durante a criopreservação dos espermatozoides de javali (CEROLINI et al., 2000), enquanto que uma vitamina solúvel em água análoga da vitamina E (Trolox) melhorou a mobilidade e integridade da membrana dos espermatozoides de javali durante no pós-descongelamento. O Trolox além preservar o sêmen e melhorar a longevidade e qualidade dos espermatozoides refrigerados e congelados-descongelados, manteve íntegra membrana e a atividade mitocondrial durante o processo de criopreservação (PEÑA et al., 2003), reduziu também,

efetivamente, a peroxidação lipídica (GAVELLA E LIVOPAC, 2000), e danos ao DNA (DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO et al., 2009).

2.8. Antioxidantes x ROS x Espermatozoides

A ação combinada de antioxidantes não enzimático (vitamina E) e enzimático (N-acetil-cisteína), pode neutralizar as ROS, resultando em uma oxidação/redução celular ou numa reação de equilíbrio (SILVA, 2006). Apesar da importância reconhecida dos antioxidantes na prevenção do estresse oxidativo do sêmen, há inúmeras controvérsias quanto à sua utilização (NICHII, 2003). Estas surgem pelo fato que as ROS desempenham importante papel na fertilização (SENGOKU et al., 1998). Desta forma, o tratamento com antioxidantes, pode ser benéfico ou deletério, de acordo com o tipo, quantidade e associação ou não de antioxidantes (NICHII, 2003).

A administração via oral, em coelhos, de vitamina E, ácido ascórbico e a sua associação demonstrou melhorias nas características do espermatozóide, assim como a diminuição significativa na geração de ROS e aumento na atividade da glutathione S-transferase (YOUSEF, et al., 2003). Já em humanos, a suplementação oral com NAC (600mg/dia) inibiu morte celular programada (apoptose) de espermatozoides oriundos dos túbulos seminíferos (ERKKILÄ et al., 1998). HATAMOTO (2004) constatou que a suplementação 500mg/animal/dia de vitamina E, diminuiu os efeitos nocivos da dexametasona no ejaculado de cães. FAROMBI et al. (2008) demonstraram que a associação da vitamina C e NAC minimizaram os efeitos deletérios do tratamento de tetraciclina sobre a produção de testosterona, células espermáticas e parâmetros seminais de ratos. Em humanos foi constatado que a combinação de NAC (600mg/dia) e vitamina E (400UI/dia), por via oral, em pacientes submetidos a quimioterapia, aumentaram as concentrações séricas de glutathione peroxidase, diminuindo as ROS, e citocinas pro-inflamatórias (TONBARY et al., 2009).

Em taurinos, a adição da cisteína ao meio diluidor do sêmen, impediu a perda de motilidade espermática pela inibição da peroxidação lipídica em amostras de sêmen congelado e descongelado (BILODEAU et al, 2001). Em estudo realizado por THUWANUT et al. (2008), a adição do antioxidante análogo hidrossolúvel da vitamina E – Trolox (5mM) ou da N-acetil-cisteína (5mM) ao diluente TRIS gema de ovo, contendo Equex STM antes da congelação, propiciou aumento da motilidade progressiva, integridade de membrana e diminuição dos defeitos em DNA dos espermatozoides recuperados de epidídimo de gatos após descongelação. Em contrapartida MICHAEL et al, (2009) observaram a adição de 5mMol ao meio diluente resultou em efeitos deletérios ao ejaculado canino durante a criopreservação, enquanto que concentrações de 1 e 2,5mM de NAC não alteraram os parâmetros espermáticos avaliados.

De acordo com os estudos referidos, dois antioxidantes se destacam em relação aos demais. A vitamina E, que é um antioxidante natural, lipossolúvel, presente nas células espermáticas e desempenha papel crucial na quebra da reação de peroxidação iniciada pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) (WANG e QUINN, 1999). E os tióis, que inclui a cisteína e a N-acetilcisteína (NAC). Ambas, cisteína e NAC, são precursores da biossíntese intracelular da glutathione (BILODEAU et al, 2001).

Sendo assim, utilizou-se a vitamina E e N-acetil-cisteína como antioxidantes de eleição para o desenvolvimento do presente estudo, uma vez que, não há estudos associando estes ao meio diluidor durante a criopreservação de células espermáticas obtidas de epidídimo canino.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Verificar se a adição de N-acetil-cisteína e da vitamina E, isolados ou associados, ao meio diluente TRIS (TRIS + gema + ácido cítrico + frutose) interferem na preservação das células espermáticas epididimais caninas.

3.2. Objetivos Específicos

Averiguar qual das concentrações (0,5, 2,5 ou 5mM) de antioxidantes, NAC e vitamina E (associados ou não) é a mais indicada na criopreservação das células espermáticas oriundas de epidídimo canino.

Analisar pelos testes complementares o efeito dos antioxidantes (NAC e vitamina E) nas diferentes concentrações sobre as células espermáticas submetidas a refrigeração (48 horas) e após congelação/descongelação.

Mensurar e comparar o índice de lipoperoxidação dos meios contendo antioxidantes (NAC e vitamina E) em diferentes concentrações associados ou não.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Os animais foram provenientes da rotina do Setor de Obstetrícia e Reprodução Animal do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, *campus* de Jaboticabal – UNESP.

Comissão de ética e bem estar animal (CEBEA), protocolo 018813/09.

Um total de 75 machos da espécie canina, sem predileção de raça, com idades entre um e cinco anos, considerados hígidos pela avaliação clínica, hematimétrica e bioquímica, foram submetidos à orquiectomia eletiva (Protocolo anestésico – Anexo A). Imediatamente após a retirada das gônadas, estas foram imersas em solução fisiológica NaCl 0,9% contidas em um frasco de vidro devidamente identificado, e transportados para o laboratório.

4.2. Obtenção do Recuperado Espermático

A cauda do epidídimo e ducto deferente foram dissecados da gônada e colocados em uma placa de petri mantida inclinada, ato contínuo, com auxílio de uma lâmina de vidro, o conjunto foi comprimido, e os espermatozoides recuperados em 1mL de solução de ringer simples, a técnica foi adaptada de MARTINS et al. (2003).

4.3. Constituição das Unidades Experimentais

Os 75 cães foram divididos grupos de 5, formando 15 unidades experimentais (UEs). Os animais de cada UE foram orquiectomizados no mesmo dia e em sequencia imediata, sendo a recuperado espermático armazenado em tubos de 15mL para a realização das análises.

4.4. Grupos Experimentais

Cada grupo experimental (G), foi composto por cinco unidades experimentais. Em cada G uma concentração de antioxidante foi testada, sendo GI, GII e GIII suplementados com 5,0, 2,5 ou 0,5mMol de antioxidantes respectivamente (Figura 1). Em todos os grupos o antioxidante foi acrescentado para uma concentração de 80×10^6 espermatozoides.

O conteúdo de cada UE foi aliquoteado em 12. Em seguida as partes foram centrifugadas à 800g por 10 minutos. Após este período o sobrenadante foi desprezado, e o pellet ressuspendido em meio TRIS, onde três das aliquotas receberam vitamina E (VE). Outras três foram acrescidas de N-acetilcisteína (NAC), outras três receberam a associação da vitamina E com a N-acetilcisteína (NV), e as três ultimas não receberam antioxidante. Uma alíquota de cada amostra foi avaliada a fresco, outra após 48 horas de refrigeração à 4°C, e a terceira após congelação/descongelação.

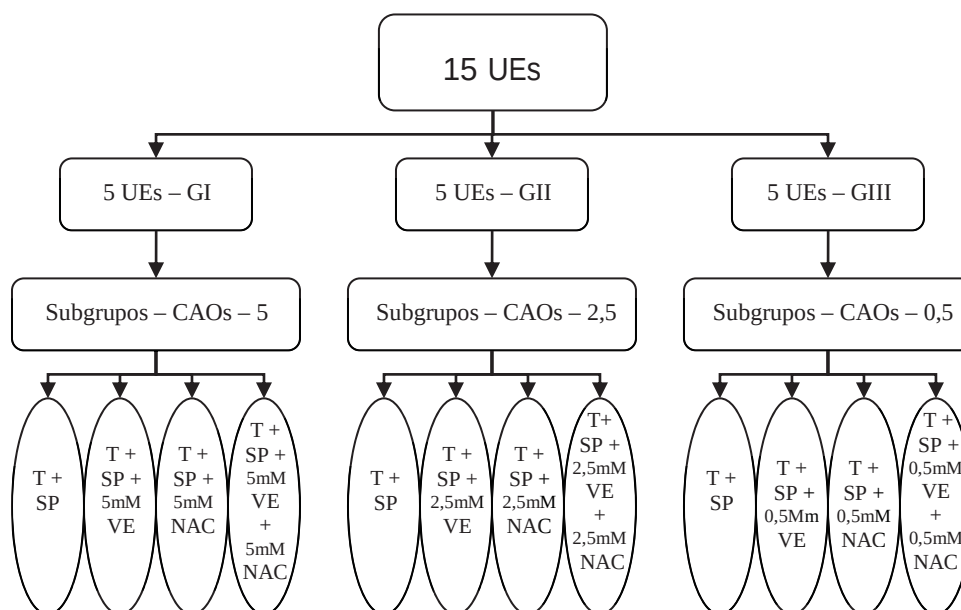


Figura 1. Diagrama da divisão das 15 unidades experimentais (UEs), nos grupos experimentais (GI, GII, GIII), e suas subdivisões, com adição de 5, 2,5 e 0,5mMol de antioxidantes.

CAOs: Concentração de antioxidantes adicionados ao meio diluidor para cada 80×10^6 espermatozoides; T: Meio diluidor TRIS; SP: Espermatóides; VE: Antioxidante Vitamina E; NAC: Antioxidante N-acetil-cisteína.

4.5. Refrigeração e Congelação

Uma amostra de cada subgrupo, foi avaliada a fresco, após refrigeração à 4°C em container de transporte (Botutainer®), por 48 horas e após o processo de congelação/descongelação. As alíquotas submetidas à congelação foram envasadas em palhetas de 0,5 mL, com concentração de 40×10^6 espermatozoides por palheta. As palhetas foram refrigeradas à 5°C durante 60 minutos e congeladas à uma distância de 6cm do vapor de nitrogênio líquido por 20 minutos, e então mergulhadas e armazenadas em botijão criogênico. A descongelação foi realizada à 70°C por oito segundos conforme PEÑA E LINDE-FORSBERG (2000) e analisadas após 10 minutos (Figura 2).

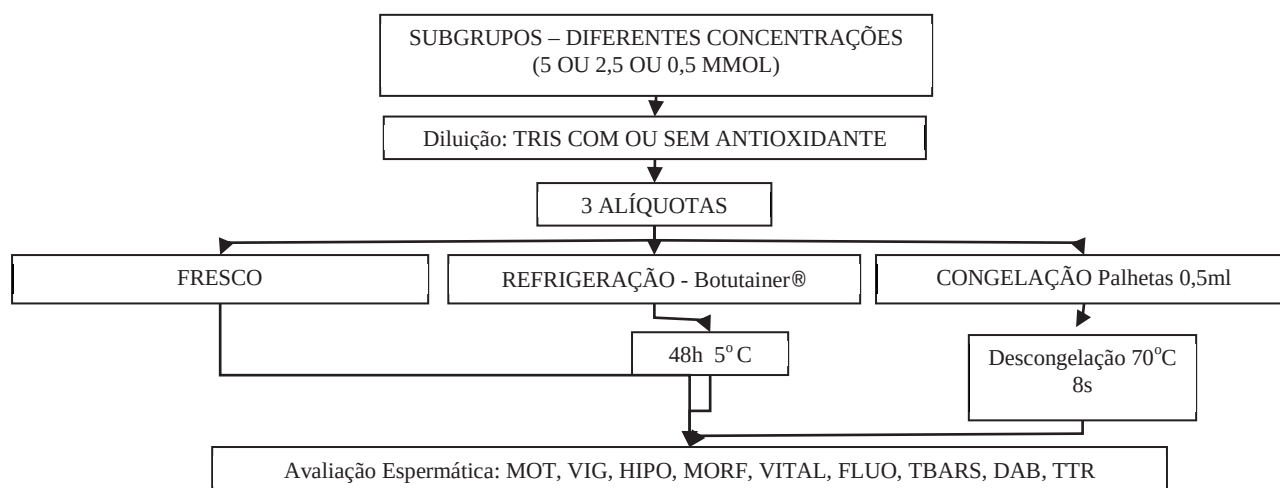


Figura 2. Fluxograma do delineamento experimental.

MOT: motilidade progressiva; VIG: vigor; HIPO: teste hiposmótico; MORF: morfologia espermática; VITAL: teste supra vital; FLUO: teste de fluorescência; TBARS: mensuração da lipoperoxidação; TTR: teste termo resistência; DAB: teste de atividade citotóxica.

4.6 Meio Diluidor

Utilizou-se como meio diluidor o TRIS-gema: ácido cítrico (1,7g), Hidroximetilaminometano – TRIS (3g), frutose (1,25g), gema de ovo (20mL), amicacina (0,02g), OEP (0,02%) e glicerol (7mL), sendo este último utilizado apenas no meio destinado a congelamento dos espermatozoides, e água destilada (100mL). Cada grupo experimental recebeu uma concentração de antioxidante utilizando o mesmo diluidor.

O pH do diluidor adicionado de 5 mMol de NAC isolada ou associada à vitamina E foi de 5,4, este não foi corrigido para 6,8, com intenção de não interferir no meio padrão. O pH de todas as concentrações e antioxidantes restantes, assim como o meio controle Tris-gema, foi de 6,8.

4.7. Avaliação Espermática

4.7.1. Concentração Espermática

Imediatamente após a recuperação espermática, realizou-se a concentração espermática, onde foi realizada uma diluição de 1:20, uma parte do material espermático para vinte partes de água, em seguida a concentração espermática foi determinada pela leitura realizada na câmara de Neubauer.

4.7.2. Morfologia Espermática

Uma amostra do material foi diluída em 2,9% de citrato de sódio, juntamente com o corante descrito por POPE et al (1991), em seguida incubou-se por 70 segundos em temperatura ambiente. Ato contínuo foi realizado um esfregaço em lâmina de vidro e a leitura de 100 células, em microscópio óptico em objetiva de 1000x.

4.7.3. Motilidade e Vigor Espermáticos

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

4.7.4. Teste Hiposmótico

Este teste foi realizado de acordo com a técnica descrita por JEYEDRAN et al. (1984). Utilizou-se 1,0mL de uma solução (Anexo B) com frutose na concentração de 100mOsm/Kg, acrescida de 20 μ L dos espermatozoides no meio diluidor. Essa solução foi incubada em banho Maria à 37°C, durante 60 minutos. Após este período uma amostra foi colocada entre lamina e lamínula, e então foram contadas 100 células em microscópio de contraste de fase, em aumento de 400x. As células foram classificadas quanto a presença ou não da cauda enrolada (Figura 3). O número total de células espermáticas que apresentaram membrana plasmática íntegra foi obtido pela subtração do número de espermatozoides com cauda enrolada patológica daqueles com cauda enrolada resultantes do teste hiposmótico.



Figura 3. Fotomicrografia de células espermáticas oriundas de epidídimo canino, 1. reativo ao teste hiposmótico, com membrana plasmática íntegra; 2. com membrana plasmática lesada, em microscópio com contraste de fases, em aumento de 400x.

4.7.5. Teste Supra Vital

Uma gota do material espermático foi colocado em lâmina, em seguida uma gota do corante eosina amarela¹, estas foram homogeneizadas, e o esfregaço foi confeccionado. A leitura foi realizada em microscópio de luz em aumento de 100x. Espermatozoides corados em vermelho indicaram células mortas, já a ausência desta coloração representou células vivas (Figura 4). O resultado foi expresso em porcentagem de espermatozoides viáveis. Foram contadas 200 células espermáticas.

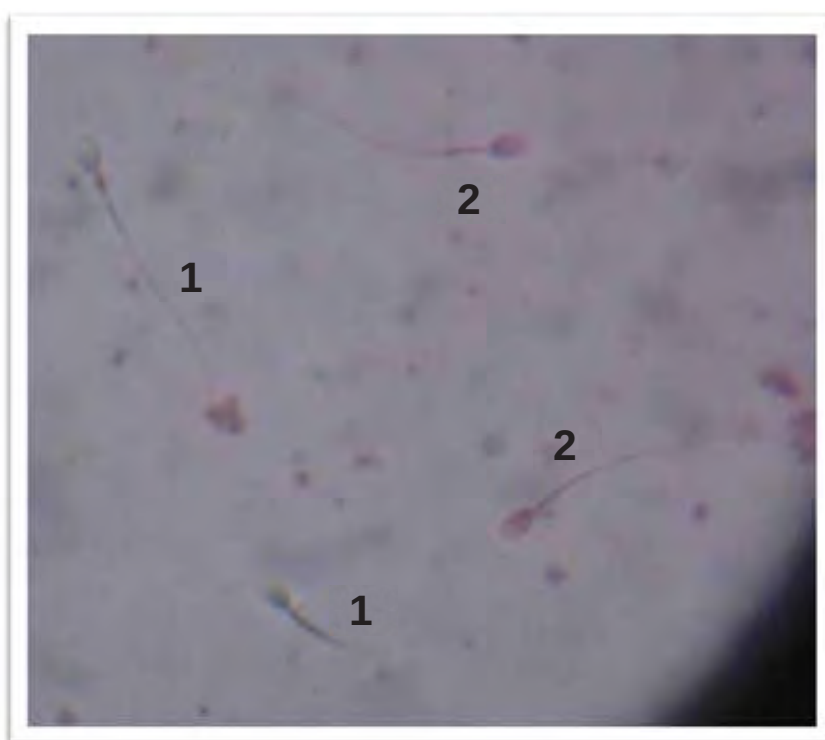


Figura 4. Fotomicrografia de células espermáticas oriundas de epidídimo canino, células espermáticas brancas, classificadas como vivas (1) e rosas como mortas (2), segundo teste supra vital, utilizando o corante eosina amarela, observado em microscópio óptico, em aumento de 100x.

¹ Eosina Amarela 3% Embralab

4.7.6. Teste de Fluorescência

O teste de fluorescência foi realizada de acordo com a técnica descrita por HARRISON E VICKERS (1990), e adaptada ao sêmen de cão por CUNHA et al. (1996). Uma alíquota de 10µL da UE foi homogeneizada com 40µL da solução de trabalho (Anexo C), ato continuo uma gota do material foi depositado entre lâmina e lamínula e foi analisado em microscopia de epifluorescência (480-610nm) sob objetiva de 1250X, foram contadas 100 células.

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

Os espermatozoides apresentaram as seguintes colorações (Figura 5):

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

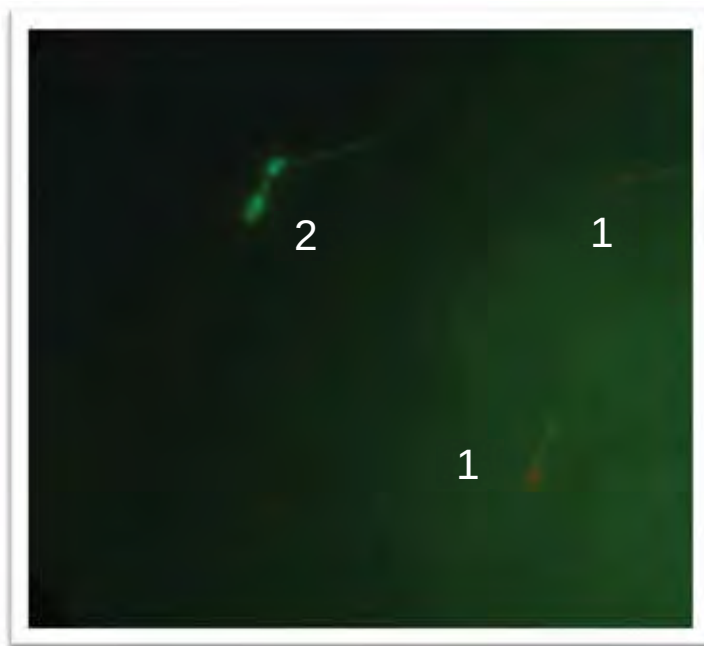


Figura 5. Fotomicrografia de células espermáticas oriundas de epidídimo canino, célula espermática vermelha são classificadas com membrana plasmática lesada (1) e verde com membrana plasmática íntegra (2), pelo teste de fluorescência, observada em microscópio de fluorescência, em aumento de 1000X.

4.7.7. Teste de Atividade Citoquímica (Coloração DAB)

A atividade citoquímica foi determinada pelo método descrito por HRUDKA (1988), onde 50µL da UE foi adicionado à 150µL da solução trabalho (ANEXO D). Ato continuo as avaliações foram realizadas em aumento de 1000X, sob óleo de imersão, usando microscopia de contraste de fase. Foram classificados 200 espermatozoides e a avaliação da atividade mitocondrial da peça intermediária seguiu a escala de quatro classes proposta por HRUDKA (1988), onde (Figura 6):

- Classe 1: quase todas as mitocôndrias são ativas, ou seja contém um produto de reação enegrecida dando a bainha mitocondrial a aparência de um cilindro compacto e proeminente;

- Classe 2: bainha mitocondrial parece fragmentada, isto é, consiste em segmentos ativos e inativos com predominância dos ativos;
- Classe 3: espermatozoides com menos da metade da bainha mitocondrial ativa e com poucas mitocôndrias ativas dispersas;
- Classe 4: espermatozoides completamente inativos.

Cada classe foi multiplicada por um fator de correção que segue 1=1,0, 2=0,5, 3=0,25, 4=0,0. Desta forma calculou-se o índice de atividade citoquímica (IAC).

$IAC = \text{escore total} / \text{número de espermatozoides classificados} \times 100.$

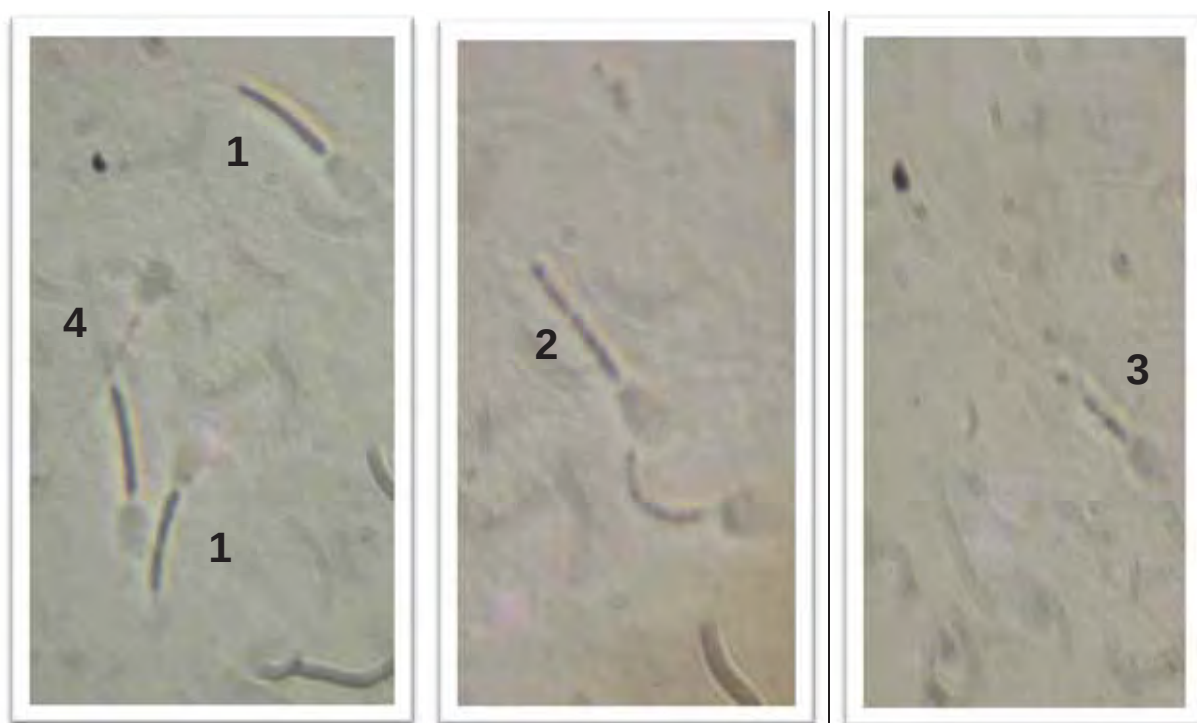


Figura 6. Fotomicrografia de células espermáticas oriundas de epidídimo canino, submetidas à coloração de DAB. Classificação da atividade mitocondrial dos espermatozoides, onde em 1. quase todas as mitocôndrias são ativas, em 2. segmentos ativos e inativos com predominância dos ativos, em 3. menos da metade da bainha mitocondrial ativa e com poucas mitocôndrias ativas dispersas e em 4. mitocôndrias completamente inativos, observados em microscópio com contraste de fases no aumento de 1000X.

4.7.8. Mensuração da lipoperoxidação (OH⁻)

A extensão da degradação da desoxirribose por radical hidroxil gerados foi mensurada pelo ensaio do ácido Tiobarbitúrico (TBARS) descrito por PAYA et al. (1992). Foi adicionado à 2mL da solução (Anexo E), 500µL do conteúdo espermático e 500µL de PBS², em seguida as amostras foram postas sob fervura por 15 minutos, ato contínuo em gelo moído por mais 15 minutos, e então centrifugadas por 15 minutos. Posteriormente os resultados de mensuração de lipoperoxidação foram expressos em nmol de TBARS/40x10⁶ espermatozoides mediante curva padrão de MDA realizada ao espectrofotômetro colorimétrico (532nm).

4.7.9. Teste Termo Resistência (TTR) – Lento

Este teste consistiu na incubação de uma amostra do recuperado espermático mais o diluidor, em banho Maria a 37°C, por tempo pré estabelecido de três horas, após este período a motilidade progressiva e o vigor espermático foram avaliados conforme citado anteriormente (DIMITROPOULOS, 1967).

4.8. Análise Estatística

As análises estatísticas foram executadas no programa computacional SAS (“Statistical Analysis System”). Os dados foram submetidos ao teste de normalidade do resíduo (Cramer-von Mises). Quando os valores apresentaram distribuição normal foram submetidos ao teste Tukey, quando não, foram submetidos Kruskal-Wallis e Friedman, sendo que o primeiro foi

² Dulbecco's Phosphate Buffered Saline – Sigma D8662

utilizado para delineamento inteiramente casualizado e o segundo para blocos casualizados. Os dados obtidos do primeiro referido foram expressos em médias $\pm$ desvio padrão, e do segundo em mediana (mínimo-máximo). Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

5. RESULTADOS

As características das células espermáticas recuperadas do epidídimo encontravam-se dentro dos valores de normalidade para a espécie canina (JOHNSTON et al., 2001). Não observou-se diferença entre as UE ($p>0,05$) e os defeitos morfológicos encontrados encontram-se descritos na tabela 1. A concentração média observada foi de 1104×10^6 células espermáticas recuperadas por unidade experimental.

Tabela 1. Percentual das alterações morfológicas de espermatozoides oriundos de epidídimo canino, observadas nas unidades experimentais dos grupos experimentais (GI, GII e GIII), classificadas em defeitos menores, maiores, e totais. Jaboticabal – 2012.

	UEs - GIII	UEs – GII	UEs – GI
Defeitos menores	18%	13,8%	17,8%
Defeitos maiores	9,8%	7%	7,6%
Defeitos totais	27,8%	20,8%	25,4%

UEs. Unidades experimentais

5.1. Motilidade e Vigor

A adição dos antioxidantes nas diferentes concentrações (0,5, 2,5, 5mMol), não diferiu quanto motilidade e vigor espermáticos, antes e após a realização do teste TTR, exceto a suplementação do meio diluidor com 5mMol dos antioxidantes NAC isolada, ou associada à vitamina E, que promoveu efeito deletério às células espermáticas após o período de refrigeração e descongelação ($p<0,05$, Tabela 2-5).

Observou-se diferença significativa, em relação à motilidade e vigor com o decréscimo da concentração dos antioxidantes suplementados ao meio diluidor ($p<0,05$, Figura 7 e 8).

Tabela 2. Percentual da motilidade das células espermáticas, recuperadas de epidídimo de cães, mediana (mínimo – máximo), comparando diferentes concentrações (0,5, 2,5, 5mMol) de vitamina E e/ou NAC adicionadas ao meio diluidor, avaliados a fresco, após período de refrigeração e após o processo de congelação/descongelação. Jaboticabal – 2012.

[] mMol	Fresco			
	C	VE	NAC	NV
5,0	80 (70-90) ^A	80 (70-90) ^A	80 (70-90) ^A	80 (70-90) ^A
2,5	85 (70-90) ^A	85 (70-90) ^A	85 (70-90) ^A	85 (70-90) ^A
0,5	80 (80-90) ^A	80 (80-90) ^A	80 (80-90) ^A	80 (80-90) ^A
	Refrigerado			
	C	VE	NAC	NV
5,0	40 (25-70) ^A	20 (5-45) ^{AB}	0 (0-0) ^B	0 (0-0) ^B
2,5	30 (30-50) ^A	25 (20-40) ^A	20 (20-35) ^A	30 (15-35) ^A
0,5	50 (30-70) ^A	60 (40-80) ^A	60 (35-70) ^A	40 (25-50) ^A
	Descongelado			
	C	VE	NAC	NV
5,0	25 (10-25) ^A	10 (0-20) ^{AB}	0 (0-0) ^B	0 (0-0) ^B
2,5	15 (5-25) ^A	25 (0-30) ^A	5 (5-25) ^A	15 (10-25) ^A
0,5	10 (10-30) ^A	20 (0-25) ^A	25 (5-50) ^A	40 (10-50) ^A

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes, nas linhas, indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$) (Teste de Kruskal-Wallis)

[] mMol. Concentração de antioxidante adicionado ao meio diluidor; C. Controle; VE. Adição de vitamina E; NAC. Adição de N-acetilcisteína; NV. Adição de N-acetilcisteína e Vitamina E.

Tabela 3. Vigor das células espermáticas, recuperadas de epidídimo de cães, medianas (mínimo-máximo), comparando diferentes concentrações (0,5, 2,5, 5mMol) de vitamina E e/ou NAC adicionadas ao meio diluidor, avaliados a fresco, após período de refrigeração e após o processo de congelação/descongelação. Jaboticabal – 2012.

[] mMol	Fresco			
	C	VE	NAC	NV
5,0	4,0 (3,5-4,5) ^A	4,0 (3,5-4,5) ^A	4,0 (3,5-4,5) ^A	4,0 (3,5-4,5) ^A
2,5	4,5 (4-4,5) ^A	4,5 (4-4,5) ^A	4,5 (4-4,5) ^A	4,5 (4-4,5) ^A
0,5	4,0 (3,5-4,5) ^A	4,0 (3,5-4,5) ^A	4,0 (3,5-4,5) ^A	4,0 (3,5-4,5) ^A
	Refrigerado			
	C	VE	NAC	NV
5,0	3,5 (2-3,5) ^A	2 (1-2,5) ^{AB}	0 (0-0) ^B	0 (0-0) ^B
2,5	2,5 (1,5-3) ^A	2 (2-3) ^A	2 (1-3) ^A	2,5 (1,5-3) ^A
0,5	3 (1,5-3,5) ^A	3 (2,5-4,0) ^A	3 (2,5-3,5) ^A	2 (2-3) ^A
	Descongelado			
	C	VE	NAC	NV
5,0	2,5 (1,5-2,5) ^A	1 (0-1,5) ^{AB}	0 (0-0) ^B	0 (0-0) ^B
2,5	2 (1,5-2,5) ^A	2 (0-2,5) ^A	1,5 (1-2) ^A	1,5 (1,5-2) ^A
0,5	2 (2-2,5) ^A	2,5 (0-3) ^A	2,5 (2-3) ^A	3 (2,5-4) ^A

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes, nas linhas, indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$) (Teste de Kruskal-Wallis)

[] mMol. Concentração de antioxidante adicionado ao meio diluidor; C. Controle; VE. Adição de vitamina E; NAC. Adição de N-acetilcisteína; NV. Adição de N-acetilcisteína e Vitamina E.

Tabela 4. Percentual da motilidade das células espermáticas, recuperadas de epidídimo de cães, após a realização do teste TTR, valores mediana (mínimo-máximo), comparando diferentes concentrações (0,5, 2,5, 5mMol) de vitamina E e/ou NAC adicionadas ao meio diluidor, avaliados a fresco, no período de refrigeração e após o processo de congelação/descongelação. Jaboticabal – 2012.

[] mMol	Fresco			
	C	VE	NAC	NV
5,0	50 (40-50) ^A	20 (15-40) ^A	0 (0-0) ^B	0 (0-0) ^B
2,5	45 (30-60) ^A	15 (5-55) ^A	30 (20-55) ^A	35 (25-50) ^A
0,5	30 (10-70) ^A	30 (5-50) ^A	30 (10-60) ^A	40 (20-60) ^A
	Refrigerado			
	C	VE	NAC	NV
5,0	10 (3-50) ^A	5 (0-15) ^{AB}	0 (0-0) ^B	0 (0-0) ^B
2,5	5 (0-25) ^A	0 (0-10) ^A	5 (0-20) ^A	5 (0-20) ^A
0,5	5 (0-50) ^A	0 (0-5) ^A	25 (0-50) ^A	5 (0-30) ^A
	Descongelado			
	C	VE	NAC	NV
5,0	0 (0-5) ^A	0 (0-0) ^A	0 (0-0) ^A	0 (0-0) ^A
2,5	0 (0-0) ^A	0 (0-0) ^A	0 (0-15) ^A	0 (0-5) ^A
0,5	0 (0-10) ^A	0 (0-0) ^A	0 (0-10) ^A	0 (0-5) ^A

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes, nas linhas, indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$) (Teste de Kruskal-Wallis)

[] mMol. Concentração de antioxidante adicionado ao meio diluidor; C. Controle; VE. Adição de vitamina E; NAC. Adição de N-acetilcisteína; NV. Adição de N-acetilcisteína e Vitamina E.

Tabela 5. Vigor das células espermáticas, recuperadas de epidídimo de cães, medianas (mínimo-máximo), comparando diferentes concentrações (0,5, 2,5, 5mMol) de vitamina E e/ou NAC adicionadas ao meio diluidor, após a realização do teste TTR, avaliados a fresco, no período de refrigeração e após o processo de congelação/descongelação. Jaboticabal – 2012.

[] mMol	Fresco			
	C	VE	NAC	NV
5,0	2 (1,5-3) ^A	0,5 (1-2) ^A	0 (0-0) ^B	0 (0-0) ^B
2,5	3 (2-4) ^A	1,5 (1-3) ^A	2 (1,5-3) ^A	2,5 (2,5-3) ^A
0,5	2 (1,5-4) ^A	2,5 (1-3,5) ^A	2 (1,5-3) ^A	2,5 (1,5-3) ^A
	Refrigerado			
	C	VE	NAC	NV
5,0	1 (1-3) ^A	1 (0-1,5) ^{AB}	0 (0-0) ^B	0 (0-0) ^B
2,5	1 (0-2,5) ^A	0 (0-2) ^A	2 (0-2) ^A	2 (0-2) ^A
0,5	1 (0-2,5) ^A	0 (0-1,5) ^A	2 (0-2,5) ^A	1 (0-1,5) ^A
	Descongelado			
	C	VE	NAC	NV
5,0	0 (0-1) ^A	0 (0-0) ^A	0 (0-0) ^A	0 (0-0) ^A
2,5	0 (0-0) ^A	0 (0-0) ^A	0 (0-1,5) ^A	0 (0-1) ^A
0,5	0 (0-2) ^A	0 (0-0) ^A	0 (0-1,55) ^A	0 (0-1) ^A

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes, nas linhas, indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$) (Teste de Kruskal-Wallis)

[] mMol. Concentração de antioxidante adicionado ao meio diluidor; C. Controle; VE. Adição de vitamina E; NAC. Adição de N-acetilcisteína; NV. Adição de N-acetilcisteína e Vitamina E.

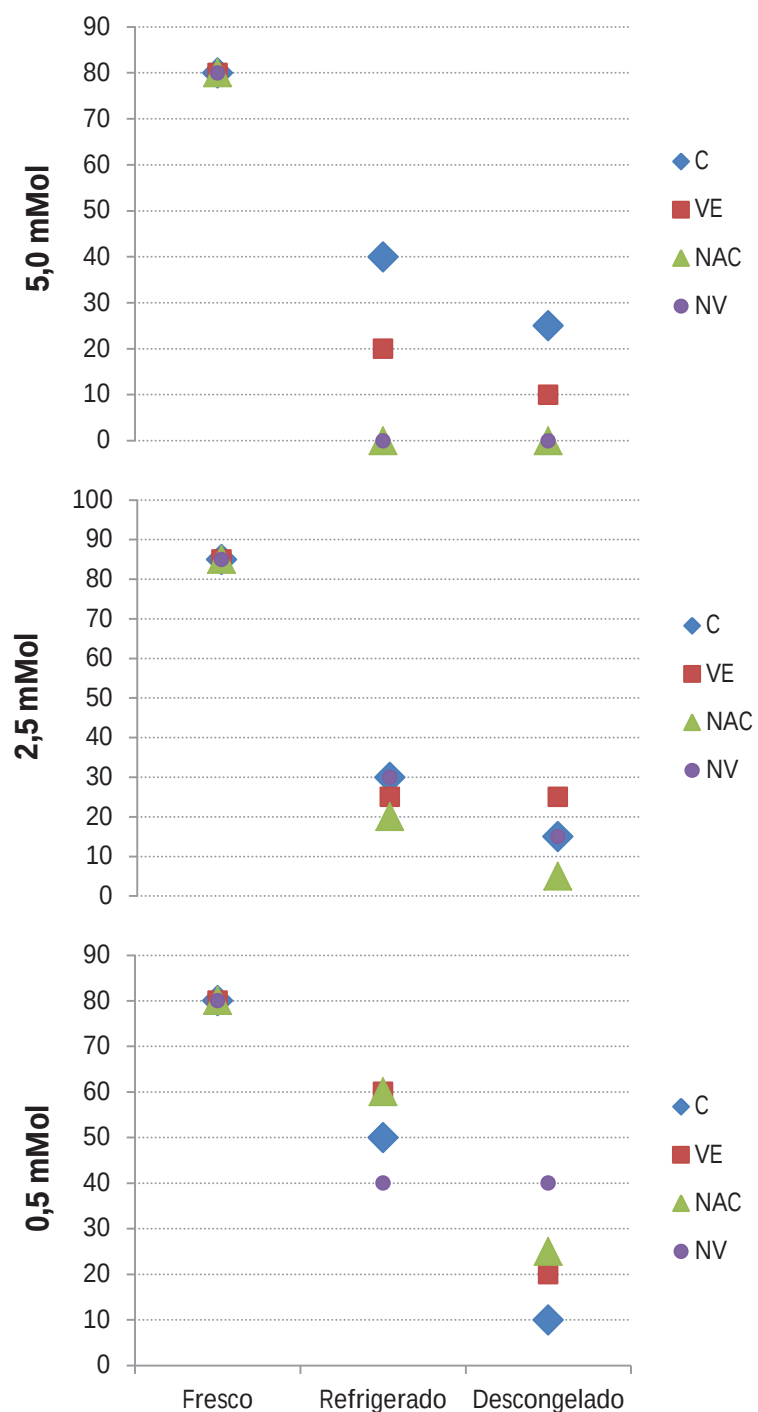


Figura 7. Representação gráfica da motilidade progressiva das células espermáticas recuperadas do epidídimo de cães, comparando as diferentes concentrações (0,5, 2,5 e 5mMol) de antioxidantes adicionados ao meio diluente TRIS, avaliadas a fresco, após 48 horas de refrigeração e após descongelação.

[] mMol. Concentração de antioxidante adicionado ao meio diluidor; C. Controle; VE. Adição de vitamina E; NAC. Adição de N-acetilcisteína; NV. Adição de N-acetilcisteína e Vitamina E.

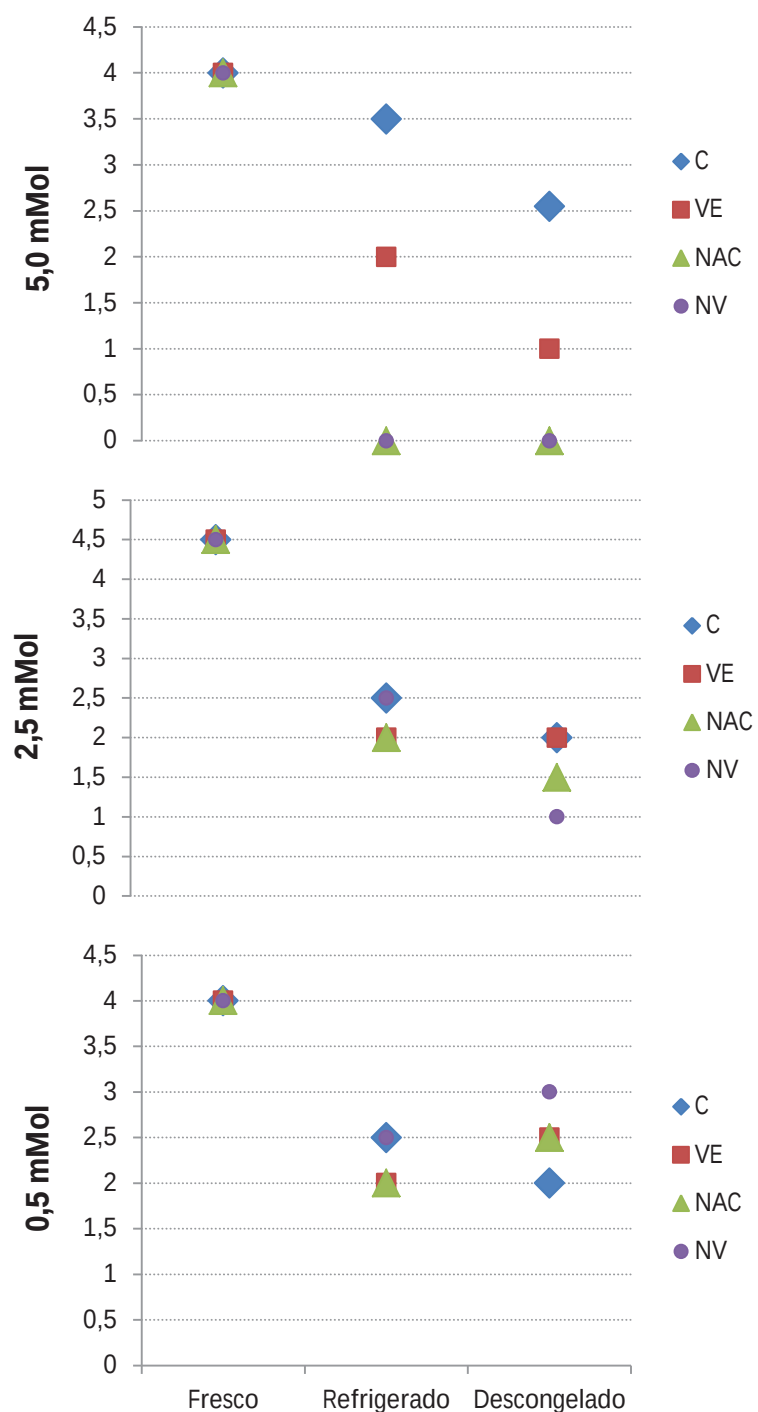


Figura 8. Representação gráfica do vigor das células espermáticas recuperadas do epidídimo de cães, comparando as diferentes concentrações (0,5, 2,5 e 5mMol) de antioxidantes adicionados ao meio diluente TRIS, avaliadas a fresco, após 48 horas de refrigeração e após descongelação.

[] mMol. Concentração de antioxidante adicionado ao meio diluidor; C. Controle; VE. Adição de vitamina E; NAC. Adição de N-acetilcisteína; NV. Adição de N-acetilcisteína e Vitamina E.

5.2. Avaliação da Integridade da Membrana

A adição de antioxidantes nas diferentes concentrações, ao meio diluidor, não diferiu do grupo controle em relação a integridade de membrana das células espermáticas, pelo teste hiposmótico e coloração de fluorescência ($p>0,05$), com exceção da suplementação do meio com 5 mMol de NAC isolada ou associada à vitamina E ($p<0,05$), em que houve um aumento da susceptibilidade da membrana plasmática às lesões tanto no processo de refrigeração quanto no de congelamento/descongelamento (Tabela 6 e 7).

Observou-se diferença significativa entre as concentrações de antioxidante adicionadas ao meio diluidor, sendo a concentração de 0,5mMol (GIII), melhor em relação as outras duas ($p<0,05$, Figura 9 e 10).

Tabela 6. Percentual de células espermáticas com membranas íntegras, recuperadas de epidídimo de cães, médias $\pm$ desvio padrão, avaliadas pelo teste hiposmótico, comparando diferentes concentrações (0,5, 2,5, 5mMol) de vitamina E e/ou NAC adicionadas ao meio diluidor, avaliados a fresco, após período de refrigeração e após o processo de congelação/descongelação. Jaboticabal – 2012.

[] mMol	Fresco			
	C	VE	NAC	NV
5,0	76 $\pm$ 10,7 ^A	69 $\pm$ 8,7 ^A	45 $\pm$ 18,4 ^A	60 $\pm$ 21,3 ^A
2,5	84 $\pm$ 5,9 ^A	78 $\pm$ 8,2 ^{AB}	72 $\pm$ 5,2 ^B	81 $\pm$ 2,6 ^{AB}
0,5	79 $\pm$ 8,9 ^A	79 $\pm$ 3,8 ^A	72 $\pm$ 7,1 ^A	71 $\pm$ 5,2 ^A
	Refrigerado			
	C	VE	NAC	NV
5,0	64 $\pm$ 14,6 ^A	53 $\pm$ 7,1 ^{AB}	17 $\pm$ 4,3 ^B	16 $\pm$ 4,5 ^B
2,5	56 $\pm$ 12,7 ^A	51 $\pm$ 13,1 ^A	55 $\pm$ 13,4 ^A	43 $\pm$ 12,9 ^A
0,5	60 $\pm$ 4,3 ^A	68 $\pm$ 8,88 ^A	67 $\pm$ 7,8 ^A	65 $\pm$ 10,0 ^A
	Descongelado			
	C	VE	NAC	NV
5,0	38 $\pm$ 9,7 ^A	27 $\pm$ 12,3 ^{AB}	4 $\pm$ 3,5 ^B	6 $\pm$ 2,0 ^B
2,5	31 $\pm$ 7,5 ^A	25 $\pm$ 10,2 ^A	22 $\pm$ 12 ^A	32 $\pm$ 7,9 ^A
0,5	36 $\pm$ 18,9 ^A	24 $\pm$ 5,8 ^A	32 $\pm$ 11,5 ^A	40 $\pm$ 20,8 ^A

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes, nas linhas, indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$) (Teste Tukey)

[] mMol. Concentração de antioxidante adicionado ao meio diluidor; C. Controle; VE. Adição de vitamina E; NAC. Adição de N-acetilcisteína; NV. Adição de N-acetilcisteína e Vitamina E.

Tabela 7. Percentual de células espermáticas com membranas íntegras, recuperadas de epidídimo de cães, valores médios $\pm$ desvio padrão, avaliadas pelo teste de fluorescência, comparando diferentes concentrações (0,5, 2,5, 5mMol) de vitamina E e/ou NAC adicionadas ao meio diluidor, avaliados a fresco, após período de refrigeração e após o processo de congelamento/descongelamento.

[] mMol	Fresco			
	C	VE	NAC	NV
5,0	77 $\pm$ 10,2 ^A	69 $\pm$ 5,3 ^{AB}	60 $\pm$ 7,4 ^B	59 $\pm$ 16,9 ^{AB}
2,5	77 $\pm$ 5,5 ^A	70 $\pm$ 9,2 ^{AB}	65 $\pm$ 4,9 ^B	72 $\pm$ 3,1 ^{AB}
0,5	81 $\pm$ 4,5 ^A	77 $\pm$ 4,1 ^A	77 $\pm$ 8,1 ^A	74 $\pm$ 7,2 ^A
	Refrigerado			
	C	VE	NAC	NV
5,0	65 $\pm$ 12,3 ^A	50 $\pm$ 11,2 ^{AB}	17 $\pm$ 10,3 ^B	16 $\pm$ 7,9 ^B
2,5	54 $\pm$ 9,6 ^A	47 $\pm$ 8,9 ^A	50 $\pm$ 7,4 ^A	48 $\pm$ 4,2 ^A
0,5	66 $\pm$ 6,2 ^A	66 $\pm$ 9,0 ^A	68 $\pm$ 4,9 ^A	65 $\pm$ 7,2 ^A
	Descongelado			
	C	VE	NAC	NV
5,0	30 $\pm$ 8,7 ^A	19 $\pm$ 9,6 ^A	5 $\pm$ 3,1 ^B	4 $\pm$ 2,9 ^B
2,5	25 $\pm$ 13,0 ^A	19 $\pm$ 8,3 ^A	18 $\pm$ 10,2 ^A	26 $\pm$ 9,4 ^A
0,5	27 $\pm$ 16,8 ^A	21 $\pm$ 7,0 ^A	26 $\pm$ 12,7 ^A	34 $\pm$ 18,2 ^A

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes, nas linhas, indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$) (Teste Tukey)

[] mMol. Concentração de antioxidante adicionado ao meio diluidor; C. Controle; VE. Adição de vitamina E; NAC. Adição de N-acetilcisteína; NV. Adição de N-acetilcisteína e Vitamina E.

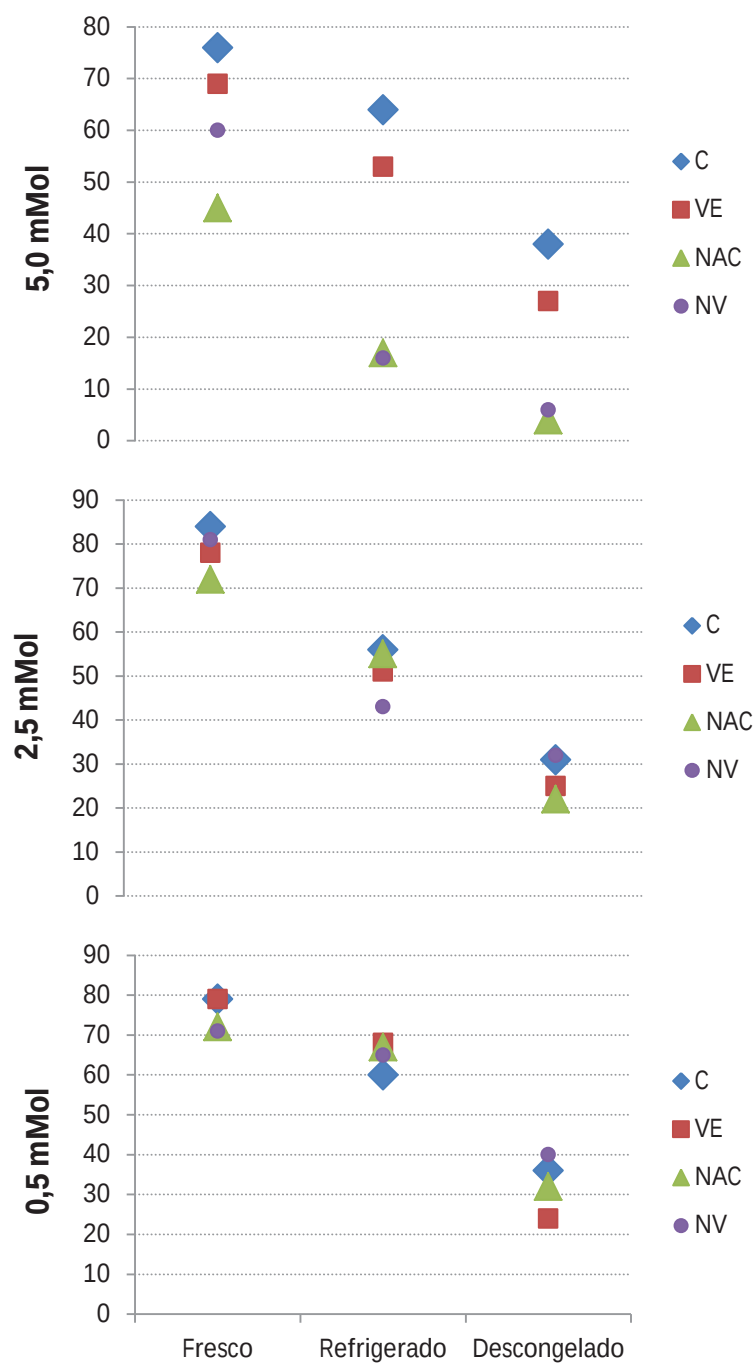


Figura 9. Representação gráfica do percentual das células espermáticas recuperadas de epidídimo canino, com membrana plasmática íntegra, avaliadas pelo teste hiposmótico, comparando as diferentes concentrações (0,5, 2,5 e 5mMol) de antioxidantes adicionados ao meio diluente TRIS, avaliadas a fresco, após 48 horas de refrigeração e após descongelação.

[] mMol. Concentração de antioxidante adicionado ao meio diluidor; C. Controle; VE. Adição de vitamina E; NAC. Adição de N-acetilcisteína; NV. Adição de N-acetilcisteína e Vitamina E.

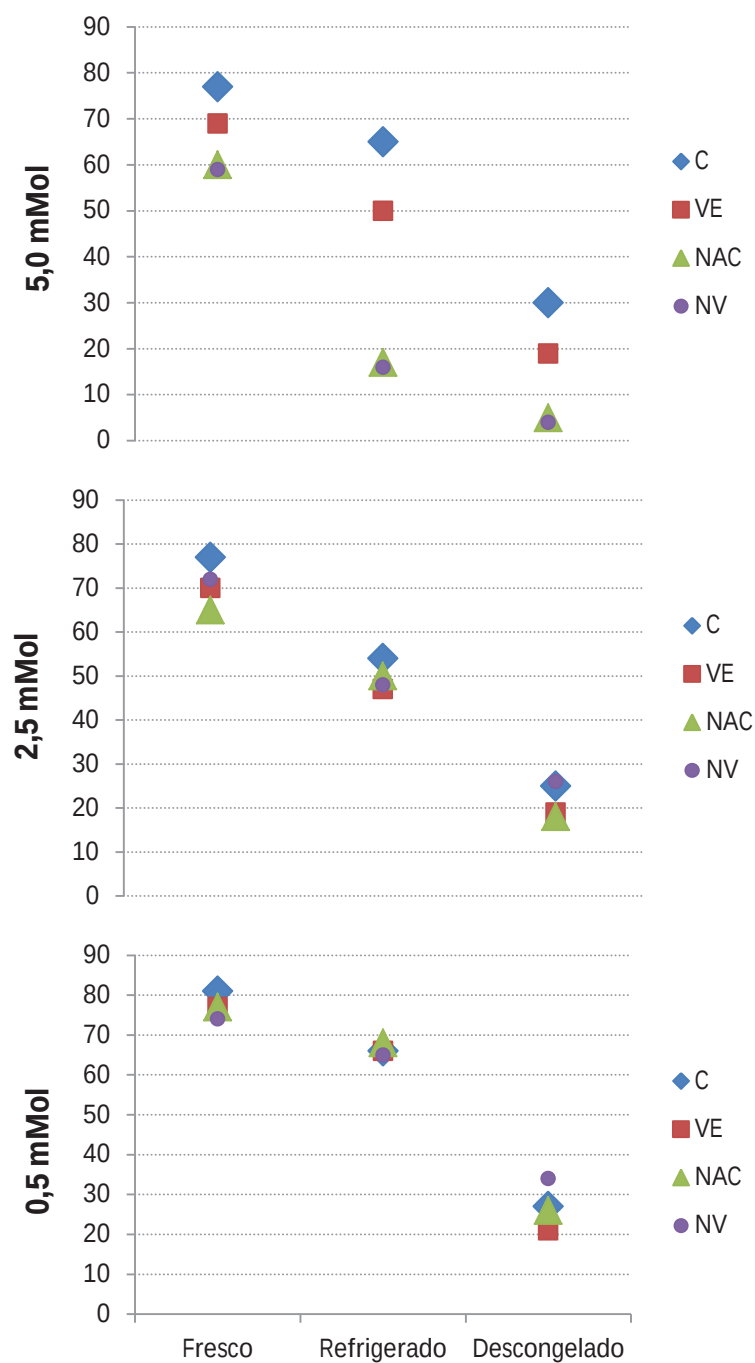


Figura 10. Representação gráfica do percentual das células espermáticas recuperadas de epidídimo canino, com membrana plasmática íntegra, avaliadas pela coloração fluorescente, comparando as diferentes concentrações (0,5, 2,5 e 5mMol) de antioxidantes adicionados ao meio diluente TRIS, avaliadas a fresco, após 48 horas de refrigeração e após descongelação.

[] mMol. Concentração de antioxidante adicionado ao meio diluidor; C. Controle; VE. Adição de vitamina E; NAC. Adição de N-acetilcisteína; NV. Adição de N-acetilcisteína e Vitamina E.

5.3. Teste Vital

A suplementação do meio com 5mMol de NAC ou da associação deste mais Vitamina E, aumentou o percentual de células mortas após a criopreservação ($p < 0,05$, Tabela 8). Enquanto a adição de 0,5mMol dos antioxidantes mostrou resultado significativo na preservação das células em relação às concentrações de 2,5 e 5mMol (Figura 11).

Tabela 8. Percentual das células espermáticas vivas, recuperadas de epidídimo de cães, valores médios $\pm$ desvio padrão, avaliadas pela coloração eosina amarela, comparando diferentes concentrações (0,5, 2,5, 5mMol) de antioxidantes adicionados ao meio diluidor, avaliados a fresco, após período de refrigeração e após o processo de congelamento/descongelamento. Jaboticabal – 2012.

[] mMol	Fresco			
	C	VE	NAC	NV
5,0	72 $\pm$ 8,8 ^A	65 $\pm$ 4,9 ^{AB}	56 $\pm$ 7,8 ^{AB}	57 $\pm$ 10,8 ^B
2,5	77 $\pm$ 4,5 ^A	73 $\pm$ 9,3 ^A	67 $\pm$ 6,3 ^A	78 $\pm$ 10,4 ^A
0,5	83 $\pm$ 6,3 ^A	82 $\pm$ 4,5 ^A	82 $\pm$ 9,1 ^A	75 $\pm$ 7,3 ^A
	Refrigerado			
	C	VE	NAC	NV
5,0	62 $\pm$ 5,0 ^A	47 $\pm$ 8,3 ^{AB}	14 $\pm$ 7,6 ^B	13 $\pm$ 7,8 ^B
2,5	48 $\pm$ 13,2 ^A	44 $\pm$ 6,8 ^A	47 $\pm$ 6,2 ^A	42 $\pm$ 7,9 ^A
0,5	64 $\pm$ 4,5 ^A	68 $\pm$ 7,9 ^A	66 $\pm$ 6,1 ^A	60 $\pm$ 6,1 ^A
	Descongelado			
	C	VE	NAC	NV
5,0	28 $\pm$ 9,7 ^A	21 $\pm$ 10,9 ^{AB}	5 $\pm$ 4,5 ^B	2 $\pm$ 2,0 ^B
2,5	21 $\pm$ 9,6 ^A	20 $\pm$ 12,5 ^A	15 $\pm$ 12,9 ^A	24 $\pm$ 4,9 ^A
0,5	27 $\pm$ 18,8 ^A	20 $\pm$ 8,4 ^A	25 $\pm$ 13,0 ^A	31 $\pm$ 15,9 ^A

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes, nas linhas, indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$) (Teste Tukey)

[] mMol. Concentração de antioxidante adicionado ao meio diluidor; C. Controle; VE. Adição de vitamina E; NAC. Adição de N-acetilcisteína; NV. Adição de N-acetilcisteína e Vitamina E.

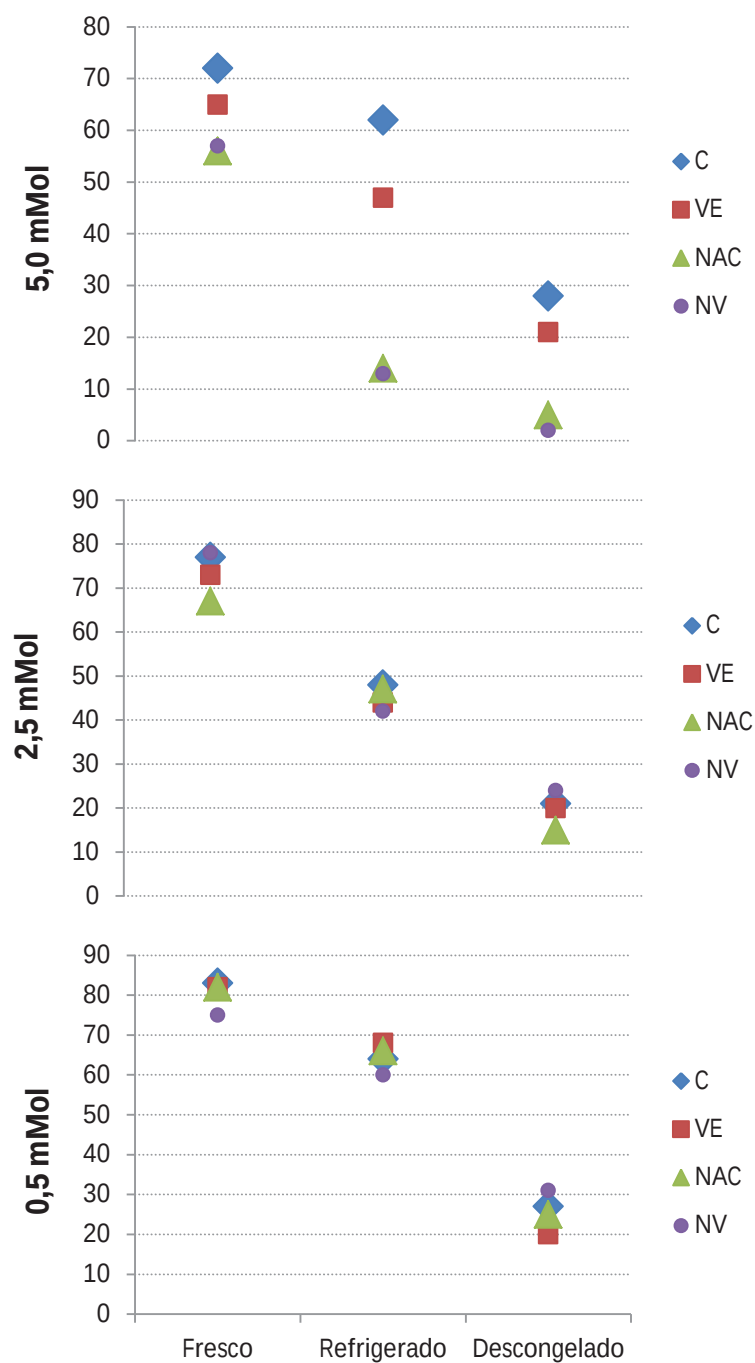


Figura 11. Representação gráfica do percentual das células espermáticas vivas recuperadas de epidídimo canino, avaliadas pela coloração eosina amarela, comparando as diferentes concentrações (0,5, 2,5 e 5mMol) de antioxidantes adicionados ao meio diluente TRIS, avaliadas a fresco, após 48 horas de refrigeração e após descongelamento.

[] mMol. Concentração de antioxidante adicionado ao meio diluidor; C. Controle; VE. Adição de vitamina E; NAC. Adição de N-acetilcisteína; NV. Adição de N-acetilcisteína e Vitamina E.

5.4. Índice de Atividade Mitocondrial

A suplementação com valores máximos de NAC isolada ou associada à Vitamina E, diminuiu significativamente o índice da atividade mitocondrial quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$, Tabela 9). Observou-se a preservação deste índice quando valores mínimos de antioxidante foram adicionados ao meio diluidor ($p < 0,05$, Figura 12)

Tabela 9. Índice da atividade mitocondrial das células espermáticas recuperadas de epidídimo de cães, medianas (mínimo-máximo), avaliadas pela coloração de DAB, comparando diferentes concentrações (0,5, 2,5, 5mMol) de antioxidantes adicionados ao meio diluidor, avaliados a fresco, após período de refrigeração e após o processo de congelamento/descongelamento. Jaboticabal – 2012.

[] mMol	Fresco			
	C	VE	NAC	NV
5,0	94 (82-96) ^A	89 (79-93) ^{AB}	80 (63-87) ^{AB}	76 (63-85) ^B
2,5	91 (88-95) ^A	92 (90-95) ^A	93 (91-95) ^A	92 (91-95) ^A
0,5	93 (88-96) ^A	91 (85-93) ^A	91 (88-93) ^A	90 (88-90) ^A
	Refrigerado			
	C	VE	NAC	NV
5,0	84 (76-87) ^A	72 (66-75) ^{AB}	41 (26-42) ^B	19 (3-43) ^B
2,5	85 (80-88) ^A	84 (80-89) ^A	76 (73-84) ^A	79 (76-89) ^A
0,5	83 (81-85) ^A	89 (86-90) ^A	87 (84-89) ^A	84 (84-86) ^A
	Descongelado			
	C	VE	NAC	NV
5	54 (50-58) ^A	46 (33-53) ^{AB}	10 (2-17) ^B	11 (6-18) ^B
2,5	61 (53-73) ^A	67 (59-71) ^A	58 (41-69) ^A	58 (50-69) ^A
0,5	59 (59-61) ^A	76 (69-79) ^A	72 (71-78) ^A	73 (72-74) ^A

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes, nas linhas, indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$) (Teste de Kruskal-Wallis)

[] mMol. Concentração de antioxidante adicionado ao meio diluidor; C. Controle; VE. Adição de vitamina E; NAC. Adição de N-acetilcisteína; NV. Adição de N-acetilcisteína e Vitamina E.

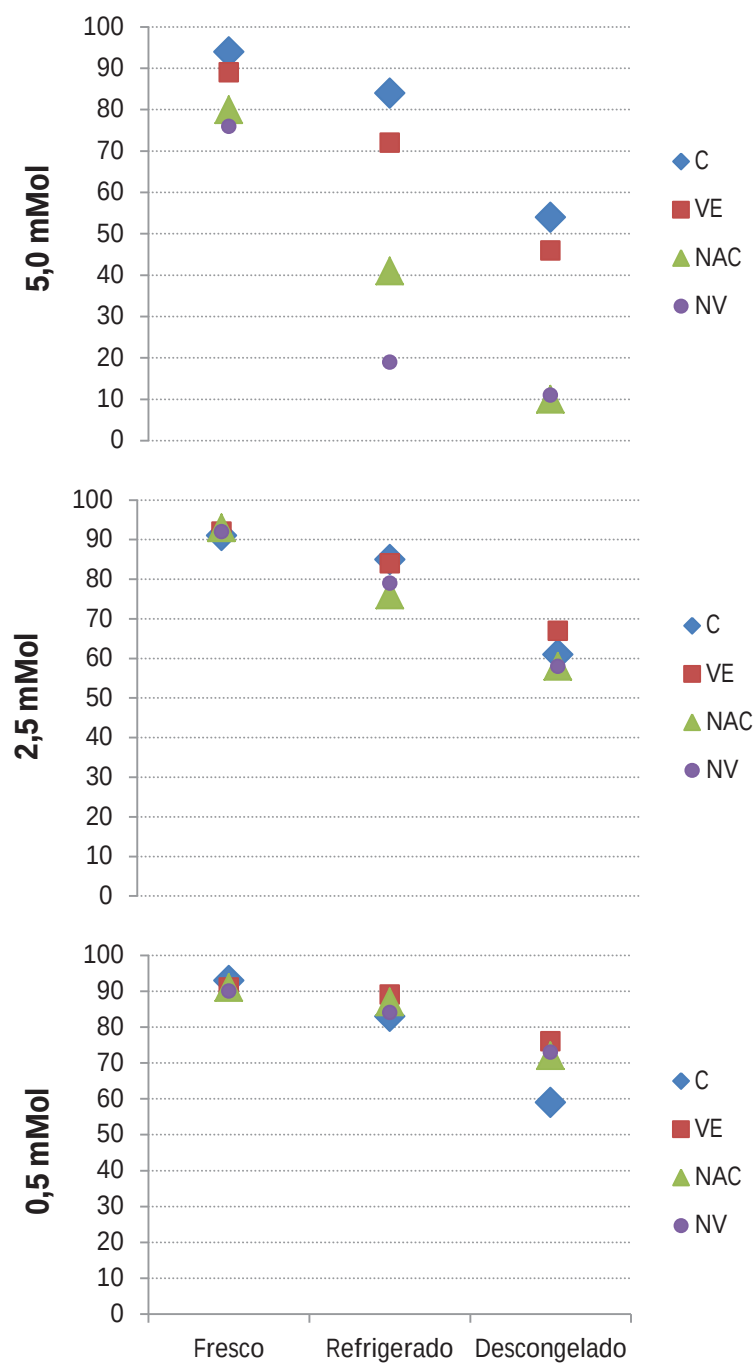


Figura 12. Representação gráfica do índice de atividade mitocondrial das células espermáticas recuperadas de epidídimo canino, comparando as diferentes concentrações (0,5, 2,5 e 5 mMol) de antioxidantes adicionados ao meio diluente TRIS, avaliadas a fresco, após 48 horas de refrigeração e após descongelação.

[] mMol. Concentração de antioxidante adicionado ao meio diluidor; C. Controle; VE. Adição de vitamina E; NAC. Adição de N-acetilcisteína; NV. Adição de N-acetilcisteína e Vitamina E.

5.5. Lipoperoxidação

A produção de radicais livres não diferiu significativamente entre as diferentes concentrações de antioxidantes e o grupo controle (Figura 13), entretanto quando foi suplementado 5mMol de vitamina E ao meio diluidor, a lipoperoxidação foi menor, adquirindo assim menor concentração de radicais livres comparado ao grupo que recebeu suplementação com NAC, a fresco e após 48 horas de refrigeração ($p < 0,05$, Tabela 10).

Tabela 10. Mensuração da lipoperoxidação (Tbars), em 40×10^6 espermatozoides, medianas (mínimo-máximo), em relação à concentração (0,5, 2,5, 5,0 mMol) do antioxidante adicionado ao meio diluidor. Jaboticabal – 2012.

[] mMol	Fresco			
	C	VE	NAC	NV
5,0	0,18 (0,16-0,25) ^{AB}	0,10 (0,06-0,11) ^A	0,23 (0,22-0,53) ^B	0,15 (0,11-0,23) ^{AB}
2,5	0,27 (0,14-0,47) ^{AB}	0,09 (0,06-0,39) ^A	0,36 (0,20-1,09) ^B	0,14 (0,11-1,47) ^{AB}
0,5	0,22 (0,13-0,54) ^A	0,24 (0,14-0,58) ^A	0,67 (0,35-1,99) ^A	0,81 (0,30-1,91) ^A
[] mMol	Refrigerado			
	C	VE	NAC	NV
5,0	0,12 (0,11-0,23) ^{AB}	0,12 (0,10-0,14) ^A	0,24 (0,19-0,32) ^B	0,14 (0,10-0,19) ^{AB}
2,5	0,16 (0,13-0,36) ^A	0,11 (0,08-0,17) ^A	0,14 (0,08-0,40) ^A	0,10 (0,10-0,22) ^A
0,5	0,31 (0,20-0,84) ^A	0,35 (0,17-0,51) ^A	0,50 (0,38-0,77) ^A	0,83 (0,35-1,12) ^A
[] mMol	Congelado			
	C	VE	NAC	NV
5,0	0,37 (0,33-0,82) ^A	0,49 (0,24-1,55) ^A	0,65 (0,30-0,88) ^A	0,55 (0,38-0,81) ^A
2,5	0,62 (0,26-1,12) ^A	0,57 (0,17-0,70) ^A	0,85 (0,30-1,46) ^A	0,65 (0,45-0,99) ^A
0,5	0,36 (0,33-0,96) ^A	0,42 (0,22-0,55) ^A	0,44 (0,23-0,57) ^A	0,51 (0,18-0,86) ^A

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes, nas linhas, indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$) (Teste de Kruskal-Wallis)

[] mMol. Concentração de antioxidante adicionado ao meio diluidor; C. Controle; VE. Adição de vitamina E; NAC. Adição de N-acetilcisteína; NV. Adição de N-acetilcisteína e Vitamina E.

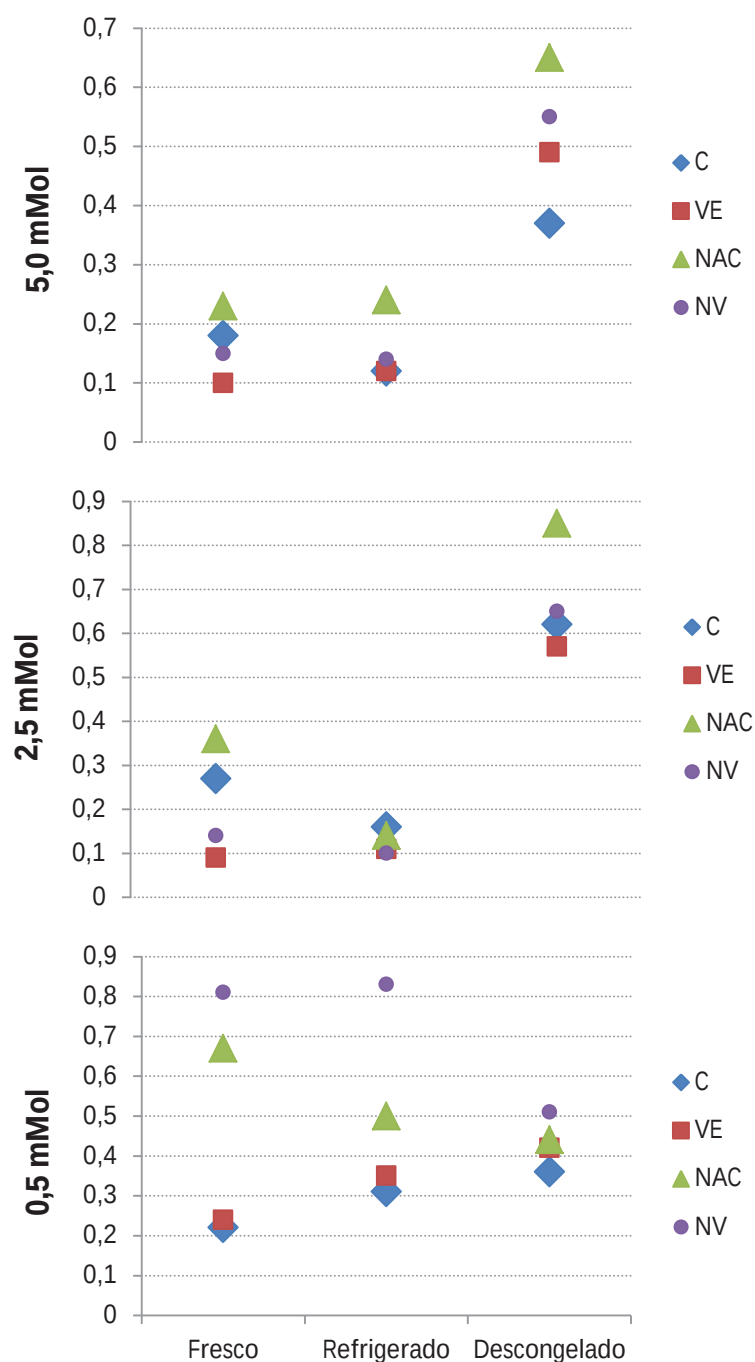


Figura 13. Representação gráfica da média da produção de radicais hidroxila das células espermáticas recuperadas de epidídimo canino, comparando as diferentes concentrações (0,5, 2,5 e 5 mMol) de antioxidantes adicionados ao meio diluente TRIS, avaliadas a fresco, após 48 horas de refrigeração e após descongelação.

[] mMol. Concentração de antioxidante adicionado ao meio diluidor; C. Controle; VE. Adição de vitamina E; NAC. Adição de N-acetilcisteína; NV. Adição de N-acetilcisteína e Vitamina E.

5.6. Diferenças dos Parâmetros entre os Períodos de Processamento (Δ)

A diferença da motilidade entre os tempos de armazenamento das células espermáticas (Δ) foram calculadas com objetivo de verificar a diminuição da motilidade em relação ao processamento dos espermatozoides.

Verificou-se após o processamento de refrigeração (48 horas) e congelação/ descongelação, que a concentração de 5 mMol para o tratamento com NAC isolada ou associada à vitamina E, apresentou diminuição significativa de motilidade em relação ao grupo controle, aumentando a variação (Δ), observado na Tabela 11. Enquanto essa associação na concentração de 0,5 mMol teve melhor desempenho da motilidade após descongelação dos espermatozoides ($p < 0,05$, Tabela 11).

Tabela 11. Variação da motilidade entre os períodos de processamento de armazenamento das células espermáticas, recuperadas de epidídimo de cães, valores médios $\pm$ desvio padrão, comparando diferentes concentrações (0,5, 2,5, 5mMol) de vitamina E e/ou NAC adicionadas ao meio diluidor. Jaboticabal – 2012.

[] mMol	Δ = Fresco – Refrigerado			
	C	VE	NAC	NV
5,0	37 $\pm$ 6,88 ^A	59 $\pm$ 7,2 ^B	81 $\pm$ 5,2 ^C	81 $\pm$ 5,2 ^C
2,5	46 $\pm$ 12,8 ^A	55 $\pm$ 12,0 ^A	58 $\pm$ 7,6 ^A	57 $\pm$ 6,4 ^A
0,5	32 $\pm$ 10,4 ^A	24 $\pm$ 8,8 ^A	27 $\pm$ 9,6 ^A	41 $\pm$ 5,6 ^A
[] mMol	Δ = Refrigerado – Descongelado			
	C	VE	NAC	NV
5,0	22 $\pm$ 9,2 ^A	13 $\pm$ 8,4 ^A	0 $\pm$ 0 ^A	0 $\pm$ 0 ^A
2,5	22 $\pm$ 9,6 ^A	9 $\pm$ 12,8 ^A	12 $\pm$ 7,6 ^A	11 $\pm$ 8,8 ^A
0,5	33 $\pm$ 17,6 ^B	42 $\pm$ 18,4 ^B	31 $\pm$ 18,8 ^B	8 $\pm$ 20,4 ^A
[] mMol	Δ = Fresco – Descongelado			
	C	VE	NAC	NV
5,0	59 $\pm$ 3,2 ^A	72 $\pm$ 8,4 ^{AB}	81 $\pm$ 5,2 ^B	81 $\pm$ 5,2 ^B
2,5	68 $\pm$ 6,4 ^A	64 $\pm$ 12,8 ^A	70 $\pm$ 8,0 ^A	68 $\pm$ 6,4 ^A
0,5	65 $\pm$ 10 ^B	66 $\pm$ 11,2 ^B	58 $\pm$ 15,6 ^{AB}	49 $\pm$ 18,8 ^A

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes, nas linhas, indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$) (Teste Tukey)

[] mMol. Concentração de antioxidante adicionado ao meio diluidor; C. Controle; VE. Adição de vitamina E; NAC. Adição de N-acetilcisteína; NV. Adição de N-acetilcisteína e Vitamina E.

Observou-se após o processamento de refrigeração (48 horas), que a concentração de 5 mMol para o tratamento com NAC isolada ou associada à vitamina E, apresentou diminuição significativa da integridade de membrana (Tabela 12 e 13), e vitalidade celular (Tabela 14) em relação ao grupo controle, aumentando a variação (Δ).

Tabela 12. Variação das células espermáticas, oriundas de epidídimo canino, vivas, observadas no teste hiposmótico, entre os períodos de processamento, valores médios $\pm$ desvio padrão, comparando diferentes concentrações (0,5, 2,5, 5mMol) de vitamina E e/ou NAC adicionadas ao meio diluidor. Jaboticabal – 2012.

[] mMol	Δ = Fresco – Refrigerado			
	C	VE	NAC	NV
5,0	11 $\pm$ 7,84 ^A	16 $\pm$ 5,28 ^{AB}	28 $\pm$ 11,5 ^{BC}	43 $\pm$ 17,8 ^C
2,5	28 $\pm$ 14,9 ^A	27 $\pm$ 10,5 ^A	18 $\pm$ 11,5 ^A	39 $\pm$ 10,2 ^A
0,5	19 $\pm$ 5,44 ^A	12 $\pm$ 8,80 ^A	06 $\pm$ 5,12 ^A	06 $\pm$ 9,60 ^A
	Δ = Refrigerado – Descongelado			
	C	VE	NAC	NV
5,0	26 $\pm$ 10,7 ^A	25 $\pm$ 7,68 ^A	13 $\pm$ 2,16 ^A	10 $\pm$ 3,52 ^A
2,5	25 $\pm$ 12,9 ^A	26 $\pm$ 8,80 ^A	32 $\pm$ 8,72 ^A	11 $\pm$ 12,6 ^A
0,5	25 $\pm$ 17,4 ^A	44 $\pm$ 8,72 ^A	35 $\pm$ 9,52 ^A	25 $\pm$ 15,8 ^A
	Δ = Fresco – Descongelado			
	C	VE	NAC	NV
5,0	37 $\pm$ 3,84 ^A	42 $\pm$ 8,00 ^A	41 $\pm$ 10,1 ^A	54 $\pm$ 17,2 ^A
2,5	53 $\pm$ 7,20 ^A	53 $\pm$ 11,0 ^A	50 $\pm$ 8,00 ^A	50 $\pm$ 6,40 ^A
0,5	44 $\pm$ 20,3 ^A	56 $\pm$ 6,32 ^A	40 $\pm$ 8,32 ^A	31 $\pm$ 13,7 ^A

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes, nas linhas, indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$) (Teste t de Tukey)

[] mMol. Concentração de antioxidante adicionado ao meio diluidor; C. Controle; VE. Adição de vitamina E; NAC. Adição de N-acetilcisteína; NV. Adição de N-acetilcisteína e Vitamina E.

Tabela 13. Variação das células espermáticas, oriundas de epidídimo canino, vivas, observadas na coloração fluorescência, entre os períodos de processamento, valores médios $\pm$ desvio padrão, comparando diferentes concentrações (0,5, 2,5, 5mMol) de vitamina E e/ou NAC adicionadas ao meio diluidor. Jaboticabal – 2012.

[] mMol	Δ = Fresco – Refrigerado			
	C	VE	NAC	NV
5,0	13 $\pm$ 12,5 ^A	19 $\pm$ 12,4 ^{AB}	43 $\pm$ 9,04 ^B	43 $\pm$ 10,8 ^B
2,5	23 $\pm$ 6,88 ^A	23 $\pm$ 12,0 ^A	16 $\pm$ 6,32 ^A	24 $\pm$ 4,16 ^A
0,5	14 $\pm$ 5,52 ^A	12 $\pm$ 9,04 ^A	9 $\pm$ 10,2 ^A	9.2 $\pm$ 7,76 ^A
[] mMol	Δ = Refrigerado – Descongelado			
	C	VE	NAC	NV
5,0	34 $\pm$ 10,5 ^A	31 $\pm$ 5,36 ^A	12 $\pm$ 4,64 ^A	12 $\pm$ 5,04 ^A
2,5	29 $\pm$ 13,8 ^A	28 $\pm$ 5,92 ^A	31 $\pm$ 7,92 ^A	21 $\pm$ 6,32 ^A
0,5	39 $\pm$ 13,0 ^A	45 $\pm$ 8,72 ^A	40 $\pm$ 7,12 ^A	30 $\pm$ 16,4 ^A
[] mMol	Δ = Fresco – Descongelado			
	C	VE	NAC	NV
5,0	47 $\pm$ 8,80 ^A	50 $\pm$ 7,36 ^A	56 $\pm$ 5,84 ^A	55 $\pm$ 12,5 ^A
2,5	52 $\pm$ 11,3 ^A	51 $\pm$ 11,2 ^A	47 $\pm$ 5,20 ^A	45 $\pm$ 7,68 ^A
0,5	54 $\pm$ 15,0 ^A	56 $\pm$ 6,32 ^A	49 $\pm$ 16,4 ^A	40 $\pm$ 15,3 ^A

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes, nas linhas, indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$) (Teste t de Tukey)

[] mMol. Concentração de antioxidante adicionado ao meio diluidor; C. Controle; VE. Adição de vitamina E; NAC. Adição de N-acetilcisteína; NV. Adição de N-acetilcisteína e Vitamina E.

Tabela 14. Variação das células espermáticas, oriundas de epidídimo canino, vivas, observadas na coloração eosina amarela, entre os períodos de processamento, valores médios $\pm$ desvio padrão, comparando diferentes concentrações (0,5, 2,5, 5mMol) de vitamina E e/ou NAC adicionadas ao meio diluidor. Jaboticabal – 2012.

[] mMol	Δ = Fresco – Refrigerado			
	C	VE	NAC	NV
5,0	10 $\pm$ 3,52 ^A	19 $\pm$ 7,76 ^B	42 $\pm$ 3,52 ^C	45 $\pm$ 3,52 ^C
2,5	29 $\pm$ 8,64 ^A	29 $\pm$ 8,64 ^A	21 $\pm$ 3,60 ^A	36 $\pm$ 3,36 ^A
0,5	19 $\pm$ 3,20 ^A	14 $\pm$ 5,52 ^A	16 $\pm$ 11,3 ^A	15 $\pm$ 5,36 ^A
[] mMol	Δ = Refrigerado – Descongelado			
	C	VE	NAC	NV
5,0	33 $\pm$ 8,16 ^A	26 $\pm$ 6,40 ^A	10 $\pm$ 5,44 ^A	11 $\pm$ 6,24 ^A
2,5	27 $\pm$ 13,6 ^A	20 $\pm$ 23,6 ^A	32 $\pm$ 5,92 ^A	18 $\pm$ 4,72 ^A
0,5	37 $\pm$ 18,9 ^A	47 $\pm$ 10,2 ^A	41 $\pm$ 9,60 ^A	29 $\pm$ 12,4 ^A
[] mMol	Δ = Fresco – Descongelado			
	C	VE	NAC	NV
5,0	44 $\pm$ 8,56 ^A	44 $\pm$ 9,04 ^A	52 $\pm$ 3,84 ^A	56 $\pm$ 8,88 ^A
2,5	56 $\pm$ 6,56 ^A	53 $\pm$ 16,6 ^A	52 $\pm$ 6,08 ^A	54 $\pm$ 7,28 ^A
0,5	55 $\pm$ 18,9 ^A	62 $\pm$ 7,92 ^A	57 $\pm$ 17,7 ^A	43 $\pm$ 10,1 ^A

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes, nas linhas, indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$) (Teste Tukey)

[] mMol. Concentração de antioxidante adicionado ao meio diluidor; C. Controle; VE. Adição de vitamina E; NAC. Adição de N-acetilcisteína; NV. Adição de N-acetilcisteína e Vitamina E.

Em relação ao índice de atividade mitocondrial, observou-se que a suplementação com os antioxidantes (Vitamina E, NAC e a associação destas), na concentração de 0,5 mMol, diferiu do controle, evitando a diminuição deste índice após o período de congelação/descongelação. O oposto foi observado na suplementação com 5 mMol ($p < 0,05$, tabela 15).

Tabela 15. Variação do índice de atividade mitocondrial, realizado pela coloração de DAB, entre os tempos de armazenamento das células espermáticas, recuperadas de epidídimo de cães, valores médios $\pm$ desvio padrão, comparando diferentes concentrações (0,5, 2,5, 5mMol) de vitamina E e/ou NAC adicionadas ao meio diluidor. Jaboticabal – 2012.

[] mMol	Δ = Fresco – Refrigerado			
	C	VE	NAC	NV
5,0	8,2 $\pm$ 2,54 ^A	16 $\pm$ 3,06 ^B	39 $\pm$ 9,44 ^C	56 $\pm$ 16,7 ^D
2,5	6,1 $\pm$ 3,08 ^A	7,8 $\pm$ 3,42 ^A	16 $\pm$ 2,4 ^A	12 $\pm$ 3,06 ^A
0,5	10 $\pm$ 2,32 ^A	1,1 $\pm$ 2,08 ^A	4,0 $\pm$ 2,34 ^A	4,8 $\pm$ 1,14 ^A
[] mMol	Δ = Refrigerado – Descongelado			
	C	VE	NAC	NV
5,0	29 $\pm$ 3,16 ^B	26 $\pm$ 8,44 ^B	28 $\pm$ 5,40 ^B	7,6 $\pm$ 10,2 ^A
2,5	23 $\pm$ 5,08 ^A	18 $\pm$ 2,92 ^A	19 $\pm$ 7,86 ^A	23 $\pm$ 6,72 ^A
0,5	23 $\pm$ 1,72 ^A	13 $\pm$ 2,14 ^A	13 $\pm$ 2,98 ^A	12 $\pm$ 0,98 ^A
[] mMol	Δ = Fresco – Descongelado			
	C	VE	NAC	NV
5,0	38 $\pm$ 2,62 ^A	44 $\pm$ 6,78 ^A	68 $\pm$ 8,36 ^B	64 $\pm$ 6,46 ^B
2,5	29 $\pm$ 5,40 ^A	26 $\pm$ 3,76 ^A	35 $\pm$ 7,28 ^A	34 $\pm$ 5,72 ^A
0,5	33 $\pm$ 2,48 ^B	14 $\pm$ 1,64 ^A	17 $\pm$ 2,32 ^A	16 $\pm$ 0,78 ^A

Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes, nas linhas, indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$) (Teste t de Tukey)

[] mMol. Concentração de antioxidante adicionado ao meio diluidor; C. Controle; VE. Adição de vitamina E; NAC. Adição de N-acetilcisteína; NV. Adição de N-acetilcisteína e Vitamina E.

5.7. Correlações

Foram observadas correlações entre os testes realizados, destacando a alta correlação entre aqueles que avaliaram a integridade de membrana, indicando acurácia nos resultados (Tabela 16).

Tabela 16. Correlação entre os testes desenvolvidos para análise das células espermáticas oriundas de epidídimo canino. Jaboticabal – 2012.

Correlação	R de Pearson	Significância
MOT X VIG	0,91	p<0,001
MOT X MOT 3	0,68	p<0,001
MOT X HIPO	0,84	p<0,001
MOT X EOS	0,90	p<0,001
MOT X FLUO	0,87	p<0,001
MOT X IAC	0,75	p<0,001
IAC X HIPO	0,81	p<0,001
IAC X EOS	0,81	p<0,001
IAC X FLUO	0,82	p<0,001
HIPO X EOS	0,94	p<0,001
HIPO X FLUO	0,93	p<0,001
EOS X FLUO	0,96	p<0,001

MOT. Motilidade; MOT 3. Motilidade após a realização do teste TTR; VIG. Vigor; HIPO. Hiposmótico; EOS. Coloração Eosina Amarela; FLUO. Coloração de Fluorescência; IAC. Índice de Atividade Mitocondrial.

6. DISCUSSÃO

Nos últimos tempos, ocorreu aumento na utilização de semen congelado ou refrigerado para a espécie canina, com isso, forte enfoque voltou-se para o estudo do melhor diluidor e, assim, do uso de antioxidantes. Acredita-se que a diminuição das ROS neste meio é de fundamental importância para manter maior viabilidade das células espermáticas.

Compreendendo que o fluido seminal contem antioxidantes naturais, trabalhos utilizando células espermáticas oriundas de epidídimo, por não conterem este fluido, apostaram em concentrações maiores de antioxidantes para a preservação dos espermatozoides (THUWANUT et al., 2008). Destarte, nosso estudo buscou a concentração ideal de antioxidantes para espermatozoides oriundos de epidídimo canino, acreditando em respostas positivas com maiores concentrações e associações de antioxidantes.

Avaliou-se deste modo, o efeito da adição de 5,0, 2,5 e 0,5 mMol do Trolox, análogo solúvel da vitamina E, NAC (n-acetilcisteína) e a associação destas, após 48 de refrigeração e processo de congelação/descongelação, por meio da motilidade, vigor, integridade de membrana, vitalidade, índice de atividade mitocondrial e lipoperoxidação espermática. O antioxidante Trolox foi empregado ao meio pela sua facilidade de diluição, quando comparado à vitamina E, pois se conhece que a atuação de ambos é semelhante (BARCLAY et al., 1995, ALBERTINI E ABUJA, 1999)

Considerando-se os resultados obtidos neste trabalho verificou-se aumento na lipoperoxidação a fresco e após o período de refrigeração ($p < 0,05$) na suplementação do meio diluidor com 5 mMol de NAC exercendo assim, efeito negativo em todos os outros parâmetros avaliados (motilidade, vigor, integridade de membrana e índice de atividade mitocondrial) ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle. O mesmo comportamento foi observado em estudo utilizando ejaculado canino (MICHAEL et al., 2010).

OEDA et al. (1997) relataram que a adição de NAC no meio diluidor de sêmen humano promoveu diminuição nos valores de pH. Tal fato foi observado no estudo em tela, onde após a adição deste antioxidante na concentração de 5 mMol, o pH do meio atingiu 5,4. Supõe-se que as células espermáticas, na

capacidade de se adequar ao meio não fisiológico, sofreram hiperativação seguida de morte celular, havendo assim maior produção de radicais livres, resultados encontrados durante a suplementação de NAC a 5 mMol ($p < 0,05$). Corroborando, MICHAEL et al. (2007) relataram que a presença de antioxidantes (NAC e vitamina E), na mesma concentração, no meio diluidor promoveu a hiperatividade precoce de espermatozoides do ejaculado canino causando, assim, danos acrossomais e na membrana plasmática.

Ainda, na concentração de 5 mMol, quando suplementada ao meio, a NAC isolada ou associada à vitamina E, foi observada redução do índice de atividade mitocondrial ($p < 0,05$). As mitocôndrias são responsáveis pela energia que dá motilidade aos espermatozoides e encontra-se nelas, juntamente com a membrana plasmática, um dos principais locais de produção das ROS (AITKEN, 1998). Observa-se neste estudo, correlação positiva entre este índice e a integridade de membrana ($r = 0,81$), assim acreditamos que por ter ocorrido lesão significativa da integridade da membrana, quando estes antioxidantes foram adicionados ao meio na concentração de 5 mMol, houve comprometimento mitocondrial, anulando sua atividade.

O Trolox adicionado em 5 mMol ao meio diluidor, não diferiu do grupo controle ($p > 0,05$), no entanto, observou-se valores menores da viabilidade espermática e da integridade de membrana, após o período de refrigeração e congelamento/descongelamento, corroborando com BAPTISTA SOBRINHO (2009), que observaram, quando adicionados 5 mMol de vitamina E, menor viabilidade e integridade de membrana dos espermatozoides de ejaculado canino. Acredita-se que a diminuição da viabilidade espermática se deve ao fato desta atuar rompendo a reação de lipoperoxidação, removendo os radicais peroxil presentes e impedindo a propagação desta reação (BENDICH, 1990; SILVA, 2006). Uma vez que o radical peroxil está envolvido na aquisição da velocidade espermática então, uma quantidade de lipoperoxidação é necessária (LOPES, 2010). Desta forma, o uso em excesso do Trolox neste estudo pode ter interrompido o ciclo de lipoperoxidação, interferindo negativamente na viabilidade espermática, que apesar de não diferir do controle ($p > 0,05$), apresentou valores menores em relação aos tratamentos utilizados.

Em contra partida, THUWANUT et al. (2008) obtiveram resultados significativos, melhorando a qualidade das células espermáticas oriundas de epidídimo felino, onde observaram-se melhor manutenção da motilidade, integridade de membrana e de DNA após descongelação, ao adicionarem 5mMol de cisteína ou da vitamina E ao meio diluidor. Idem foi observado durante a criopreservação de sêmen humano, normozoospermico ou astenozoospermico, com a adição de 5 mMol de vitamina E, onde a motilidade e a integridade do DNA foram significativamente maiores que a do grupo controle (KALTHUR et al., 2011). Este efeito contraditório ao nosso estudo provavelmente está ligado à capacidade espécie-específica dos antioxidantes, demonstrando pelos estudos citados que a concentração de 5mMol foi satisfatória para espermatozoides felinos e humanos, enquanto nosso estudo demonstra efeito deletério para células espermáticas caninas.

Em relação a viabilidade das células espermáticas durante a suplementação do meio diluente com antioxidantes na concentração de 2,5 mMol, não diferiu do grupo controle ($p > 0,05$). O mesmo foi observado quanto à lipoperoxidação ($p > 0,05$), o que corrobora com estudos que utilizaram ejaculado canino, onde o grupo que recebeu adição de NAC nesta mesma concentração não diferiu do controle após 72 horas de refrigeração (MICHAEL et al., 2010). Idem foi observado em sêmen equino, onde a adição de 2 mMol de vitamina E não apresentou resultado significativo, comparado ao grupo controle, para a manutenção dos espermatozoides à 5°C. (BALL et al., 2001). Da mesma forma a adição de 1,5 mMol de NAC ao sêmen canino, não diferiu em relação ao controle, quanto a produção de ROS, no entanto esta concentração demonstrou efeito significativo na preservação das células espermáticas após o processo de descongelação (MICHAEL et al., 2010).

Assim, os estudos demonstram que maiores concentrações de antioxidantes provocam efeitos deletérios nos espermatozoides de cães, intuindo-nos a pensar, na essencialidade das ROS para a manutenção da viabilidade espermática.

Neste trabalho, a menor concentração utilizada (0,5 mMol) de vitamina E, NAC, e ambas associadas, não diferiu do grupo controle. Apesar de não diferir significamente a adição de vitamina E apresentou maiores valores, quando comparada ao controle. A associação desta com a NAC foi o melhor

tratamento para manter a motilidade após a variação do período de congelação/descongelação (Δ , $p < 0,05$). O sinergismo desta associação se deve ao fato desses antioxidantes atuarem de formas diferentes, sabendo que a vitamina E se encontra naturalmente na membrana plasmática e que a NAC atua intracelularmente como precursor da cisteína e da glutatona, levando ao estímulo das enzimas citosólicas que atuam no metabolismo desta última (COCCO et al., 2005).

Efeito significativo foi observado na adição de 0,5 mMol de NAC ao sêmen ejaculado canino, onde MICHAEL et al. (2010) observaram melhora da motilidade espermática e da integridade de membrana após 72 horas de refrigeração. Em ejaculado da mesma espécie, quando adicionados 0,6 mMol de vitamina E, observou-se efeito significativo após a descongelação das células espermáticas (LOPES, 2010). O mesmo ainda foi averiguado por MICHAEL et al. (2009) após 72 horas de refrigeração de sêmen canino, suplementado com 0,1 mMol de vitamina E. Ainda em ejaculado canino, os mesmos pesquisadores em estudos prévios (2007), observaram efeito significativo na motilidade e na integridade de membrana, após descongelação dos espermatozoides suplementados com 0,3 mMol de vitamina E. Corroborando com os anteriores, observou-se em sêmen suíno o aumento progressivo da motilidade e redução das células com movimentos circulares após adição de 0,1 ou 0,2 mMol de Trolox ($p < 0,05$) (PEÑA et al., 2003).

Neste âmbito, utilizando a concentração mínima dos antioxidantes vitamina E, NAC e associação destas (0,5 mMol), neste estudo verificamos melhor índice de atividade mitocondrial após a variação do período de congelação/descongelação (Δ , Tabela 15), quando comparado ao grupo controle, o que sugere que concentrações mínimas são importantes para manter a viabilidade celular e de suas organelas. Entretanto, após a descongelação, o índice de atividade mitocondrial não diferiu do controle, quando adicionados 0,2 mMol de Trolox ao meio diluente de sêmen bovino (BORGES, 2008).

Não há dúvida que a suplementação do meio diluidor com antioxidantes confere maior proteção aos espermatozoides, no entanto, nosso trabalho demonstra que quando adicionamos menor concentração (0,5 mMol) apesar de não significativo, observamos, numericamente, melhor viabilidade das células

espermáticas durante a criopreservação indicando, assim, que estudos com menores concentrações de antioxidantes são necessários. No entanto, quando referimos a antioxidantes, devemos considerar que o meio diluente Tris-gema, utilizado no presente estudo, meio este consagrado para criopreservação de espermatozoides caninos possui efeito antioxidante (DESJARDINS E HAFS, 1961). Acreditamos que menores concentrações de antioxidante adicionados ao meio Tris, atuem de forma sinérgica ao existente no próprio diluidor, sendo assim novos estudos são necessários para alcançar esse ideal.

Ademais, confrontando nossos dados com a literatura consultada, afirmamos que o antioxidante é dose, espécie, e diluidor específico, que 5 mMol foi adequada para as células espermáticas de epidídimo felino e deletéria para espermatozoides provenientes do epidídimo canino.

7. CONCLUSÕES

Face aos resultados obtidos e os objetivos previamente delineados concluiu-se que:

- Menores concentrações de antioxidantes agregadas ao meio diluidor, viabilizaram a qualidade espermática.
- A associação de vitamina E e NAC, na concentração de 0,5 mMol, atuou protegendo a motilidade dos espermatozoides durante o processo de congelação/descongelação.
- A vitamina E, a NAC e a associação de ambas, na concentração de 0,5 mMol, mantiveram o índice de atividade mitocondrial dos espermatozoides durante o processo de congelação/descongelação.
- A adição de antioxidantes, vitamina E e NAC isoladas ou associadas, em diferentes concentrações (0,5, 2,5 e 5 mMol), não diferiram do controle quanto a lipoperoxidação.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, Y., LEE, D. S., SANO, H., AKIYAMA, K., YANAGIMOTO-UETA, Y., ASANO, T. Artificial insemination with canine spermatozoa frozen in a skim milk/glucose-based extender. **Journal of Reproduction Development**, v.54, n.4, p.290-294, 2008.

AGARWAL A, MAKKER K, SHARMA R. Clinical relevance of oxidative stress in male: an update. **American Reproduction Immunology**, v.59, n.1, p.2-11, 2008.

AGARWAL, A.; SALEH, R.A.; BEDAIWY, M.A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility Sterility**, v.79, p. 829–843, 2003.

AGARWALL A., PRABAKARAN S.A., SAID T.M., Prevention of Oxidative Stress Injury to Sperm. **Journal of Andrology**. v.26, n.6, p.654-660, 2005.

AITKEN RJ, WINGATE JK, DE IULIIS GN, MCLAUGHLIN EA. Analysis of lipid peroxidation in human spermatozoa using BODIPY C11. **Molecular Human Reproduction** v.13, p.203–211, 2007.

AITKEN, R.J.; BAKER, M.A. Oxidative stress and male reproductive biology. **Reproduction. Fertility..** v.16, p.581–588, 2004.

AITKEN, R.J. Molecular mechanisms regulating human sperm function. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, p.169–173, 1998.

ALBERTINI, R. e ABUJA, P.M. Prooxidant and antioxidant proprieties of Trolox C, analogue of vitamin E, in oxidation of low-density lipoprotein. **Free Radical Research**, v. 30, n. 3, p. 181-188, 1999.

AMANN R.P. Reproductive physiology and endocrinology of the dog. In: Morrow DA. **Current Therapy in Theriogenology**. 2.ed. Philadelphia: WB Saunders, 1986. p.532-538.

BARCLAY, L.R.C.; ARTZ, J.D.; MOWAT, J.J. Partitioning and antioxidant action of the water-soluble antioxidant, Trolox, between the aqueous and lipid phases of phosphatidylcholine membranes: C tracer and product studies. **Biochemistry and Biophysics Acta**, v. 1237, p. 77-85, 1995.

BALL, B.A., MEDINA, V., GRAVANCE, C.G., BAUMBER, J., Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. **Theriogenology**, v.56, p. 577–589, 2001.

BANNER W, KOCH M, CAPIN DM, HOPF SB, CHANG S, TONG TG. Experimental chelation therapy in chromium, lead, and boron intoxication with N-acetylcysteine and other compounds. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.83, p.142–147, 1986.

BAPTISTA SOBRINHO, C.A. Efeito do tratamento com antioxidantes na qualidade de espermatozoides criopreservados de cães. **Tese** (Doutorado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia , Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

BARTELS, P. LUBBE, K. JILIANM I., FRIEDMAN, Y., VAN DICK, G., MORTIMER, D. In vitro maturation and fertilization of lion (*Panthera leo*) oocytes using frozen-thawed epididymal spermatozoa recovered by cauda epididymectomy of an immobilized lion. **Theriogenology**, v.53, p. 325, 2000.

BAUST J.G. The management of mammalian cells at low temperature. **Cell Preservation Technology**. v.6, n.2, p.111-112, 2008.

BECCAGLIA M., ANASTASI P., CHIGIONI S., Tris-lecithin extender supplemented with antioxidant catalase for chilling of canine semen. Paper presented at the 6th International Symposium on Canine and Feline Reproduction & 6th Biennial **EVSSAR** Congress, Vienna, Austria, 2008.

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

BILODEAU J. F.; BLANCHETTE, S.; GAGNON, C.; SIRARD, M.A., Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**. v.56, p.275–86, 2001.

BORGES, J.C., Efeito da utilização de antioxidante no diluidor para a criopreservação de sêmen bovino avaliado através de testes complementares, inseminação artificial e fecundação in vitro. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. **Tese** (Doutorado), Jaboticabal, São Paulo, 2008.

CASSANI, P., BECONI, M. T.; O’FLAHERTY, C. Relationship between total superoxide dismutase activity with lipid peroxidation, dynamics and morphological parameters in canine semen. **Animal Reproduction Science** v.86, p.163–173, 2005.

CBRA, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal, 2ed, Belo Horizonte, **CBRA**, 1998.

CEROLINI S, MALDJIAN A, SURAI P, NOBLE R. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. **Animal Reproduction Science**, v.58, p.99–111, 2000.

CHEN, H.; CHOW, P.H.; CHENG, S.K.; CHEUNG, A.L.; CHENG, L.Y. WS O, Male genital tract antioxidant enzymes: their source, function in the female, and ability to preserve sperm DNA integrity in the golden hamster. **Journal Andrology** v.24, p.704–711, 2003.

COCCO, T., SGOBBO, P., CLEMENTE, M., LOPRIORE, B., GRATAGLIANO, I., DI PAOLA, M., VILLANI, G., Tissue-specific changes of mitochondrial functions in aged rats: effect of a long-term dietary treatment with N-acetylcysteine. **Free Radical Biological Medicine**, v.38, p.796–805, 2005.

COHEN MV. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? **Ann International Medicine**; v.111, p.918-931, 1989.

CRABO BG, ZIMMERMAN KJ, GUSTAFSON B, HOLTMAN M, KOH TJ, GRAHAM EF, Effect of low doses of alpha-chlorohydrin on fertility and semen characteristics and binding of the drug of spermatozoa in swine. **International Journal of Fertility**, v.20, n.2, p.87-94, 1975.

CUNHA, I.C.N. Criopreservação do sêmen de cães. Botucatu, **Tese** (doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. 59p. 2002.

CUNHA, I.C.N.; LOPES, M.D.; ZUCCARI, C.E.S.N. Padronização da técnica fluorescente para avaliação da integridade de membranas espermáticas na espécie canina. In: **Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias**, 15, 1996, Campo Grande. Proceedings... Mato Grosso: Brasil, p.411. 1996.

DESJARDINS, C. & HAFS, H.D. Enzymatic degradation of hydrogen peroxide in egg yolk. **Journal of Dairy Science**, v. 44, p. 1183, 1961.

DIMITROPOULOS, R. La signification du test de La thermorésistance dans l'appréciation de La valeur fécondant Du sperma congelé. **Animal Medicine Veterinarian**, v.4, p 215-224, 1967.

DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, A. E., FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R., GARCÍA-ALVAREZ, O., MAROTO-MORALES, A., GARDE, J. J., AND MARTÍNEZ-PASTOR, F. Washing increases the susceptibility to exogenous

oxidative stress in red deer spermatozoa. **Theriogenology** v.72, p.1073–1084, 2009.

ENGLAND, G. C. W.; PONZIO, P., Comparison of the quality of frozen-thawed and cooled-rewarmed dog semen. **Theriogenology** v.46, p.165-171, 1996.

ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of dog semen: a review. **Journal Reproduction Fertility**. v.47, n.202, p.243-255, 1993.

ERKKILÄ, K.; HIRVONEN, V.; WUOKKO, E.; PARVINEN, M.; DUNKEL, L., Nacetyl-L-cysteine inhibits apoptosis in human male germ cells in vitro. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**; v.83, p.2523–2531, 1998.

FAROMBI, E. O.; UGWUEZUNMBA, M.C.; EZENWADU, T.T.; OYEYEMI, M.O.; EKOR, M., Tetracycline-induced reproductive toxicity in male rats: Effects of vitamin C and N-acetylcysteine. **Experimental and Toxicologic Pathologic**, v.60, p.77-85, 2008.

FARSTAD W. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. **Animal Reproduction Science**, v.60–61, p.375–387, 2000.

FARSTAD, W. Assisted reproductive technology in canid species. **Theriogenology** v.53, n.204, p.175-186, 2000.

FARSTAD, W., Cryopreservation of canine semen - new challenges. Paper presented at the 6th International Symposium on Canine and Feline Reproduction & 6th Biennial **EVSSAR** Congress, Vienna, Austria, 2008.

FERNÁNDEZ-SANTOS MR, DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO AE, ESTESO MC, GARDE JJ, MARTÍNEZ-PASTOR F. Refrigerated storage of red deer epididymal spermatozoa in the epididymis, diluted and with vitamin C supplementation. **Reproduction Domestic Animal**. V.44, n.2, p.212-220, 2009.

FERNANDEZ-SANTOS, M.R.; MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCIA-MACIAS, V.; ESTECO, M. C.; SOLER, A. J.; PAZ, P.; ANEL, L.; GARDE, J.J., Extender osmolality and sugar supplementation exert a complex effect on the cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) epididymal spermatozoa. **Theriogenology**, v.67, p.738-753, 2007.

FERREIRA A. L. A., MATSUBARA L.S., Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista Associação Medica Brasil**; v.43, n.1, p.61-68, 1997.

FOOTE RH. Fertilizing ability of epididymal sperm from dead animals (Letter to the editor). **Journal of Andrology**; v.21, n.3. p.355, 2000.

GAÑÁN N, GOMENDIO M, ROLDAN ER. Effect of storage of domestic cat (*Felis catus*) epididymides at 5 degrees C on sperm quality and cryopreservation. **Theriogenology**. V.72, n.9, p.1268-1277, 2009.

GARDE, J., AGUADO, M., PÉREZ, S., GARRIDO, D., PÉREZ-GUZMÁN, M., MONTORO, V. Physiological characteristics of epididymal spermatozoa from postmortem rams. **Theriogenology**, v.41, p.203, 1994.

GAVELLA, M., AND LIPOVAC, V. Antioxidative effect of melatonin on human spermatozoa. **Archives of. Andrology**. v.44, p.23–27, 2000.

GOOVAERTS IGF, HOFLACK GG, VAN SOOM A, DEWULF J, NICHI M, DE KRUIF A, ET AL. Evaluation of epididymal semen quality using the Hamilton–Thorne analyser indicates variation between the two caudae epididymides of the same bull. **Theriogenology**; v.66, p.323–30, 2006.

GRIVEAU, J.F.; LE LANNOU, D., Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. **International Journal**, 1997.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol** v.186, p.1-85, 1990.

HALLIWELL B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **Journal of Neurochemistry** v.59, p.1.609-1.623, 1992.

HALLIWELL B: Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. **American Journal of Medicine** v.91, p.14S–22S, 1991.

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

HATAMOTO, L. K., Efeito do estresse e da suplementação oral com vitamina E sobre os parâmetros seminais, peroxidação lipídica de componentes seminais e a atividade das enzimas antioxidantes presentes no plasma seminal. **Tese** (doutorado), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2004.

HEISE A, THOMPSON PN, GERBER D. Influence of seminal plasma on fresh and post-thaw parameters of stallion epididymal spermatozoa; **Animal Reproduction Science**; v.124, n.3-4, p.192-201, 2011.

HERSHKO C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Seminars in Hematology**, v. 26, p. 277-285, 1989.

HISHINUMA M, SUZUKI K, SEKINE J. Recovery and cryopreservation of sika deer (*Cervus nippon*) spermatozoa from epididymides stored at 4 °C. **Theriogenology**, v.59, p.813–820, 2003.

HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, p. 47-58, 2000.

HORI, T., HAGIUDA, K., ENDO, S., HAYAMA, A., KAWAKAMI, E. AND TSUTSUI, T. Unilateral intrauterine insemination with cryopreserved caudal epididymal sperm recovered from refrigerated canine epididymides. **Journal Veterinary Medicine Science** v.67, p.1141–1147, 2005^B.

HORI, T., HAGIUDA, K., KAWAKAMI, E. AND TSUTSUI, T., Unilateral intrauterine insemination with prostatic fluid-sensitized frozen caudal epididymal sperm in beagle dogs. **Theriogenology** v.63, p.1573–1583, 2005^A.

HRUDKA F., Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. **International Journal Andrology**, v.11, n.5, p.457-458, 1988.

IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J. P. Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. **Theriogenology**, v.55, n.2, p.671- 684, 2001.

IKEDA H, KIKUCHI K, NOGUSHI J, TAKEDA H, SHIMADA A, MIZOKAMI T, ET AL. Effect of preincubation of cryopreserved porcine epididymal sperm. **Theriogenology**; v.57, p.1309–1318, 2002.

INTERNACIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE AND NATURAL RESOURCE. **IUCN** Red list of Threatened Species, 2008.

JELEZARSKY L, VAISBERG CH, CHAUSHEV T, SAPUNDJEV E. Localization and characterization of glutathione peroxidase (GPx) in boar accessory glands, seminal plasma, and spermatozoa and activity of GPx in boar semen. **Theriogenology**, v.69, p.139–145, 2008.

JEYEDRAN, R. S.; VAN DER VEN, H. H.; PEREZ-PELAEZ, M., Development of an assay to assess the functional integrity of human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, Colchester, v.70, n.1, p.219-228, 1984.

JOHNSTON, S.D.; KUSTRITZ, M.V.R.; OSLON, P.N.S., Semen collection, evaluation and preservation. In: **Canine and Feline Theriogenology**. Philadelphia: W.B. Saunders, p.287-306, 2001.

KAABI, M.; PAZ, P.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; BOIXO, J. C.; ROUISSI, H.; HERRAEZ, P.; ANEL, L., Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. **Theriogenology** v.60, p.1249–1259, 2003.

KALTHUR, G.; RAJ, S.; THIYAGARAJAN A.; KUMAR, P.; ADIGA, S.K., Vitamin E supplementation in semen-freezing medium improves the motility and protects sperm from freeze-thaw-induced DNA damage. **Fertility and Sterility**, v.95, n.3, p. 1449-1451, 2011.

KASHIWAZAKI, N.; YAMAGUCHI, R.; UESUGI, R.; HISHIYAMA, N.; KIM, M.; NAKATSUKASA, E., et al., Sperm motility, plasma membrane integrity, and binding capacity to homologous zona pellucida of cryopreserved epididymal sperm in the domestic cat. **Journal Reproduction Development**; v.51, p.735–739, 2005.

KIKUCHI, K., NAGAI, T. KASHIWAZAKI, N., IKEDA, H., NOGUCHI, J. SHIMADA, A. Criopreservation and ensiung in vitro fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4° C. **Theriogenology**, v.50, p. 615-623, 1998.

KISHIKAWA H, TATENO H, YANAGIMACHI R., Fertility of mouse spermatozoa retrieved from cadavers and maintained at 4 degrees C. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.116, n.2, p.217-222, 1999.

LENZI A, GANDINI L, PICARDO M, TRAMER F, SANDRI G, PANFILI E. Lipoperoxidation damage of spermatozoa polyunsaturated fatty acids (PUFA): scavenger mechanisms and possible scavenger therapies. **Frontiers in Bioscience**, v.5, p.1–15, 2000.

LOPES, B.V., Efeito da adição e/ou suplementação de antioxidante no processo de congelação/descongelação de semen de cães férteis e subférteis. **Tese** (doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e

Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo, 2010

LUVONI G.C.; KALCHSCHIMIDT E.; LEONI S.; RUGGIERO C. Conservation of feline semen – part I: cooling and freezing protocols. **J Feline Medicine Surgery**, v.5, p.203-208, 2003.

MAIA, M. S. Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de lauril sulfato de sódio (OEP), trolox-c e catalase. **Tese** (doutorado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/UNESP, Campus de Botucatu, 2006.

MARTINEZ-PASTOR F, DIAZ-CORUJO AR, ANEL E, HERRAEZ P, ANEL L, DE PAZ P. Post mortem time and season alter subpopulation characteristics of Iberian red deer epididymal sperm. **Theriogenology**. v.64, n.4, p.958-974, 2005.

MARTINS CF, DRIESSEN K, COSTA PM, CARVALHO-NETO JO, DE SOUSA RV, RUMPF R, DODE MN. Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5 degrees C by different periods of time. **Animal Reproduction Science**, v.116, n1-2, p. 50-57, 2009.

MARTINS, M.I.M, Efeito da sazonalidade sobre a função testicular de cães. **Tese** (doutorado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/UNESP, Campus de Botucatu, 2005.

MARTINS, M.I.; PADILHA, L.C.; SOUZA, F.F.; LOPES, M.D., Fertilizing capacity of frozen epididymal sperm collected from dogs. **Reproduction Domestic Animal**. Jul; n.2, p. 342-344, 2009.

MARTINS, M.I.M.; SOUZA, F.F; CHIRINÉA, V.H.; TEBET, J.M.; LOPES, M.D.; PAPA, P.O.; TRINCA, L.A., Viabilidade de espermatozoides

criopreservados, obtidos do epidídimo de cães. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, p. 367-368, 2003.

MELLO FILHO AC, HOFFMAN ME, MENEHINI R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochemical Journal**; v.218, p.273-5, 1983.

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

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

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

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

NICHI, M., Sistema de proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídios seminais de touros zebuínos e taurinos criados à campo na região de Dourados, MS, **Dissertação** (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de São Paulo, São Paulo, 2003.

NORBERG J, ÁRNER ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thiredoxin system. **Free Radicals Biology and Medicine**, v.31, p.1287-1312, 2001.

OEDA T.; HENKEL R.; OHMORI H.; SCHILL W.B., Scavenging effect of N-acetyl-L-cysteine against reactive oxygen species in human semen: a possible therapeutic modality for male factor infertility? **Andrologia**. v.29, p.125–131, 1997.

PARKS JE, HAMMERSTEDT RH. Development changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. **Biology Reproduction**; v.32, p.653–668, 1985.

PAYÁ M.; HALLIWELL B.; HOULT J.R., Interactions of a series of coumarins with reactive oxygen species. Scavenging of superoxide, hypochlorous acid and hydroxyl radicals, **Biochemical Pharmacology**, Jul 22; v. 44, n. 2, p. 205-214, 1992.

PEÑA F.J., NUNEZ-MARTINEZ I., MORAN J.M. Semen technologies in dog breeding: an update. **Reproduction Domestic Animal**, v.41, p.21–29, 2006.

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

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

PONGLOWHAPAN S., CHATDARONG K., SIRIVAIDYAPONG S., LOHACHIT C. Freezing of epididymal spermatozoa from dogs after cool storage for 2 or 4 days. **Theriogenology**, v.66, p.1633-1636, 2006.

POPE, C.E.; ZHANG, Y.Z.; DRESSER, B.L., A simple staining method for evaluating acrossomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo Wildlife Medicine**, v.22, p.87-95, 1991.

RIGAU T, FARRÉ M, BALLESTER J, MOGAS T, PEÑA A, RODRÍGUEZ-GIL JE., Effects of glucose and fructose on motility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. **Theriogenology**. v.56, n.5, p.801-815, 2001.

SAID TM, AGARWAL A, SHARMA RK, THOMAS JR AJ, SIKKA SC. Impact of sperm morphology on DNA damage caused by oxidative stress induced by betanicotinamide adenine dinucleotide phosphate. **Fertility Sterility**; v.83, n.1, p.95–103, 2005.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. **Animal. Reproduction Science**., v. 38, p. 1-36, 1995.

SANOCCA D, KURPISZ M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproduction Biology Endocrinology**, v.23, p.2-12, 2004.

SAVI, P.A.P.; JESUS, A.T.; MARTINS, M.I.M., Avaliações morfo-funcionais de espermatozoides obtidos de epidídimo canino e submetido a refrigeração por 96 horas, In: **Encontro Anual de Iniciação Científica**, 17, Foz do Iguaçu, Anais, 2008.

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

SCOTT MD, LUBIN BH, ZUO L, KUYPERS FA. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. **Journal Laboratory Clínica Medicine**, v.118, p.7-16, 1991.

SENGOKU, K.; TAMATE, K.; YOSHIDA, T.; TAKAOKA, Y.; MIYAMOTO, T.; ISHIKAWA, M., Effects of low concentrations of nitric oxide on the zona

pellucida binding ability of human spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v.69, n.3, p. 522-527, 1998.

SHARMA RK, AGARWAL A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**; v.48, n.6, p.835–850, 1996.

SIKKA SC. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. **Current Medicinal Chemistry**; v.8, p.851–862, 2001.

SIKKA, S.C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. **Journal of Andrology**, v.25, p.5-18, 2004.

SILVA, A.R., CARDOSO C.S., UCHOA, D.C., SILVA, L.D.M. Effect of tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing. **Veterinary Journal**, v.164, n3., p.244-246, 2002.

SILVA, P.F.N., Physiology of peroxidation process in mammalian sperm. **PhD thesis**. Utrech University, Ridderprint, Ridderkerk, p. 5–36, 2006.

THUWANUT, P.; CHATDARONG, K.; TECHAKUMPHU, M.; AXNÉR, E., The effect of antioxidants on motility, viability, acrosome integrity, and DNA integrity of frozen-thawed epididymal cat spermatozoa, **Theriogenology**, v.70, p.233-240, 2008.

TONBARY, Y. A. L.; HAGGAR, M. A. L.; ASHRY, R. E. L.; DAKROORY, S. E. L.; AZZAM, H.; FOUDAL, A., Vitamin E and N-Acetylcysteine as Antioxidant Adjuvant Therapy in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia, **Hindawi Publishing Corporation**, Advances in Hematology, 2009.

TREMELLEN, K., Oxidative stress and male infertility: a clinical perspective. Human Reproduction Update, v.14, p.243-258. **Andrology**. v.20, p. 61–69, 2008.

TSUTSUI T., WADA M., ANZAI M., HORI T. Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. **Journal Veterinary Medicine Science**, v.65, p.397-399, 2003.

UPRETI GC, JENSEN K, MUNDAY R, DUGANZICH DM, VISHWANATH R, SMITH JF: Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. **Animal Reproduction Science**; v.51, p.275–287, 1998.

VERNET P, AITKEN RJ, DREVET JR. Antioxidant strategies in the epididymis. **Molecular Cell Endocrinology**; v.216, p.31–39, 2004.

VERSTEGEN, J. P., ONCLIN, K. & IGUER-OUADA, M. Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris-glucose extender: in vitro and in vivo studies. **Theriogenology**, v.64, n.3, p.720-733, 2005.

VOLPE, S., LEOCI, R., AIUDI, G. & LACALANDRA, G. M., Relationship between motility and mitochondrial functional status in canine spermatozoa. **Reproduction Domestic Animal**, v.44, n.2, p.275-278, 2009.

WAHEED MM, AL-EKNAH MM, EL-BAHR SM. Some biochemical characteristics and preservation of epididymal camel spermatozoa (*Camelus dromedarius*). **Theriogenology**, v.76, n.6, p.1126-1133, 2011.

WANG, X.; QUINN, P.J., Vitamin E and its functions in membranes. **Progress in Lipid Research**; v.38, p.309–336, 1999.

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

WATSON, P.F., The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**; v.60, p.481–492, 2000.

WITTE, T. S., SCHAFER-SOMI, S., KUCHAR, A., MOSTL, E., IBEN, C. & AURICH, C. Effect of hen's egg yolk on capacitation and acrosome reaction of diluted canine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.110, n.3-4, p0.293-305, 2009.

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

YU, I.; LEIBO, S.P., Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C. **Theriogenology**, v.57, p.1179-1190, 2002.

ZÚCCARI, C.E.S.N. Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática eqüina. 1998. 121p. **Dissertação** (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista – UNESP – Botucatu, 1998.

ANEXO A

Protocolo Anestésico:

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

ANEXO B

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

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

ANEXO C

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

I - Solução estoque de DIC

DIC - 9,2mg

DMSO - 20mL

II - Solução estoque de IP

IP - 10mL

NaCl 0,9% - 20mL

III - Solução estoque de Formaldeído

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

VI - Solução estoque de citrato de sódio a 3%

Citrato de sódio - 3g

Solução fisiológica - 100mL

V - Solução de trabalho

DIC - 20µL

IP - 10µL

Formaldeído - 10µL

Solução IV - 960µL

ANEXO D

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

ANEXO E

Solução de TBA para a realização do teste de lipoperoxidação:

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