NÍVEA DE MATTOS GÓES VIEIRA

Estresse oxidativo seminal em cães: estudo da susceptibilidade dos
espermatozoides e possíveis terapias durante a criopreservação

São Paulo

2018

NÍVEA DE MATTOS GÓES VIEIRA

Estresse oxidativo seminal em cães: estudo da susceptibilidade dos espermatozoides e possíveis terapias durante a criopreservação

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcílio Nichi

De acordo:

Orientador

São Paulo

2018

Obs.: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP.

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3722
FMVZ

Vieira, Nívea de Mattos Góes
Estresse oxidativo seminal em cães: estudo da susceptibilidade dos espermatozoides e possíveis terapias durante a criopreservação / Nívea de Mattos Góes Vieira. – 2018.
111 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2018.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Márcilio Nichi.

1. Sêmen. 2. Cães. 3. Criopreservação. 4. Ácido graxo poli-insaturado. 5. Antioxidante.
I. Título.

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Marcílio Nichi
Área: Reprodução Animal

Título da proposta: "Estresse oxidativo seminal em cães: Estudo da susceptibilidade dos espermatozoides e possíveis terapias durante a criopreservação de espermatozoides".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP (ID 003409)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 12/junho/2018) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Espécies reativas de Oxigênio (EROs) desempenham um importante papel na fisiologia espermática. No entanto, o desequilíbrio entre a capacidade antioxidante e a produção de EROs, também conhecido como estresse oxidativo, pode ser extremamente prejudicial aos espermatozoides. Essa célula é altamente susceptível ao estresse oxidativo devido ao seu citoplasma reduzido e consequente limitação na reserva antioxidante citoplasmática. Além disso, os espermatozoides exibem em sua membrana uma grande quantidade de ácidos graxos polinsaturados (PUFAs), facilmente oxidadas pelas EROs. Por outro lado, esses ácidos graxos, conferem fluidez a membrana plasmática, desempenhando um importante papel nos processos de fertilização além de proteger os espermatozoides durante a criopreservação. Com base nessas afirmações, o tratamento com ácidos graxos polinsaturados durante a criopreservação parece ser uma terapia interessante. No entanto, parece plausível associar essa terapia com um tratamento antioxidante para prevenir a exacerbada peroxidação lipídica. Portanto, o objetivo deste estudo é associar o tratamento antioxidante com suplementação de ácido docosaenoico (DHA, ácido graxo polinsaturado) durante a criopreservação de sêmen canino. Para esse propósito, no primeiro estudo, a susceptibilidade espermática a diferentes EROs e ao malondialdeído (um produto da peroxidação lipídica) será avaliado na presença ou ausência de plasma seminal, a fim de avaliar o possível efeito protetor contra os desafios oxidativos. Além disso, o objetivo deste estudo também é identificar o composto mais prejudicial ao espermatozoide canino para direcionar uma terapia antioxidante específica. Assim, em um segundo estudo, a associação terapêutica entre o ácido graxo polinsaturado DHA e o antioxidante de escolha, baseado no primeiro estudo, será realizado durante a criopreservação espermática em cães."

Comentário da CEUA: "Houve alteração no título do projeto e em alguns procedimentos, plenamente justificado pelos proponentes e sem obice no âmbito desta comissão".

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretária
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: VIEIRA, Nívea de Mattos Góes Vieira

Título: **Estresse oxidativo seminal em cães:** estudo da susceptibilidade dos espermatozoides e possíveis terapias durante a criopreservação

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Data: 14 / 12 / 2018

Banca Examinadora

Prof. Dr.: MARCILIO NICHI

Instituição: FMVZ – USP Julgamento: APROVADA

Prof. Dr.: CAMILA INFANTOSI VANNUCHI

Instituição FMVZ – USP Julgamento: APROVADA

Prof. Dr.: SILVIA EDELWEISS CRUSCO

Instituição: UNIP – Externo Julgamento: APROVADA

Prof. Dr.: CRISTINA DE FATIMA LUCIO

Instituição: UnG – Externo Julgamento: APROVADA

Prof. Dr.: ANDRESSA DALMAZZO

Instituição: Externo Julgamento: APROVADA

DEDICATÓRIA

Dedico,

Aos meus pais, que são meus melhores amigos e maiores exemplos.

À minha cachorrinha Tequila que, durante as intermináveis horas diante do computador, sempre permaneceu no meu colo, fornecendo amor incondicional e apoio moral.

Ao meu marido Andre, companheiro de todas as horas.

Aos meus avós, estando neste ou noutro plano, que sempre acreditaram e confiaram em mim.

A Deus, por sempre me iluminar e guiar meus caminhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, que sempre iluminou meu caminho e me deu esperança nos momentos de desespero e cansaço. Nos momentos mais críticos, onde a desilusão, o desânimo e a ansiedade pareciam tomar conta do meu ser, era Nele que depositava minha esperança e foi Ele quem me ajudou a chegar até aqui.

Foi um período de muito aprendizado, muita dedicação e muito trabalho. Foi também uma fase de novos conhecimentos, novas amizades conquistadas e velhas amizades fortalecidas.

Enumerar um a um, a todos que colaboraram comigo neste trabalho, chega a ser injusto, tamanho foi o apoio que recebi, direta ou indiretamente, para que conseguisse realizar mais este sonho em minha vida.

Portanto, desde já, peço desculpas caso alguém não seja citado. Se o fiz, garanto não ter sido de maneira intencional.

Aos que acompanharam de maneira mais próxima, no entanto, formalizo aqui minha gratidão eterna:

Ao meu orientador Marcílio Nichi, por toda a paciência e por ser, sempre, tão tranquilo e amigo.

Ao professor Visintin, que me acolheu em um primeiro momento, sendo meu orientador e confiando em mim, mesmo sem me conhecer direito.

Ao meu marido, Andre, por todo amor, paciência, compreensão, companheirismo, apoio, incentivo e abdicação de momentos juntos.

À minha família: meus pais Márcia e Eli, minha irmã Angélica, meus avós Sinésio (em memória) e Alice, meus tios Eli e Roberto, Beth e Toninho, meus sogros Lisa e Nardo; meus tios por consideração Clau e Homero, pois sem eles não teria estrutura e condições de seguir em frente. Sempre com muitas orações, fé e apoio.

Às minhas sobrinhas Alice, Izabel e Olívia pelos sorrisos, brincadeiras e amor.

Aos meus animais Minnie, Mimo, Calvin, Melissa, Xu, Luana, Tuti, Toninha, Teco, Caco Antibes, Gisele Bünchen e Filó (todos em memória), Miúxa, Dolly, Jabulane, Tuchê, Vilminha, Frida, todos motivadores para eu querer estudar e melhorar.

Mas, dentre todos os meus bichos, um agradecimento especial à Tequila, que sempre esteve em meu colo em todos os momentos de estudo, me dando “apoio moral”. Uma companheira inseparável pra vida e para todo o sempre.

Aos colegas pós-graduandos e, principalmente amigos: Andressa (que mesmo antes de eu saber que iria trilhar os caminhos da reprodução, já me inspirava), Daniel (que me “trouxe” para a reprodução animal), Diego (que sempre com muita paciência e discernimento me orientou nessa nova área, pra mim, ainda desconhecida), Giulia (éramos conterrâneas, nos conhecemos no dia da prova, nos tornamos companheiras e sempre me ajudou em tudo), Maíra, Brunão, Luana, Bárbara, Adriano, Roberta, Raphaela, Gabriel, Beto, Cláudia, Camilla Mota, todos muito dispostos sempre, mesmo eu não fazendo parte da rotina por eu trabalhar fora da Universidade. Muito obrigada por toda dedicação, amizade, compreensão e também por serem muito parceiros nas festas.

Aos professores da FMVZ/USP: Valquíria, Camila, Ricardo, Mayra, Cláudia, Pietro, Clair, Fábio, que sempre me socorreram quando precisei de ajuda.

Aos funcionários do departamento: Harumi, Thaís, Roberta, Loide, Miguel, Josimar, Sandra.

Às funcionarias da biblioteca da FMVZ/USP: Maria Laet, Patrícia e Sandra, pela paciência e carinho.

Às pessoas maravilhosas da “Casas das Teses”: Sérgio pai, Sérgio filho e Júlio, que no momendo de desespero para imprimir a tese, me ajudou com muita paciência e profissionalismo.

Um capítulo especial, nestes agradecimentos, não poderia deixar de ser ao Exército Brasileiro, que sempre me apoiou em todos os momentos de necessidade, dispensas, com os animais, com os militares.

Aos militares TC Davys, Cel Vladimir, TC José Paulo, meus comandantes que deram um voto de confiança e permitiram que tudo isso fosse possível, autorizando minhas “ausências” na rotina do trabalho; TC Sobrinho, meu ex-chefe que me inspirou e me apoiou desde o primeiro momento; Cap Augusto e Cap Felipe, que sempre acreditaram em mim; Sgt Jailton, Sgt Ailton, Sgt Rhamon, Cb Normandia, Cb Silva Vieira, Cb G. Almeida, Cb Moura Luz, Sd Tadeu, Sd Moreira Silva, Sd Hugo Sanches, Sd Souza Neto, Sd Daniel, Sd Phelipe Silva, Sd Duque, Sd Custódio, Sd Vinícius, Sd Feitosa, Sd Tiago Tavares, Sd Castro, Sd Guilherme Soares, Sd Luan, Sd Igorliche, Sd Daniel Pereira, Sd Dos Santos, Sd Isaías, Sd

Josué, Sd Ático, todos colegas militares que muito me auxiliaram durante a parte prática do projeto.

Aos cães, motivo principal da minha profissão e que participaram do trabalho: Skillanc Chamois Inca (Mike), Davi do 2ºBPE, Dilber do 2ºBPE, Folke do Recanto do Engenho, Narlon do 2ºBPE, Hunter do 2ºBPE, Max São Miguel Arcanjo, Snow do Palo Verde, Gobi do 2ºBPE (Selva), Átila e Chorão.

Aos meus colegas militares que não eram da Seção de Cães de Guerra, Maj Eronides, Maj Giesen, Cap Martins, Ten Juliana, Ten Mariana, Ten Rani, Ten Guerra, Ten Prado, Ten Izzo, Ten Rodrigues, Ten Batista, que sempre estavam dispostos a me ouvir, ajudar com os problemas do quartel, me socorrer em momentos de “sanhaço”.

À Veterinária e amiga Juliana Morad, que soube me esperar para conseguirmos trilhar, juntas, nosso caminho na Medicina Veterinária em Sorocaba.

Aos meus amigos “paisanos”, por fazerem parte da minha vida, dos meus horários de diversão e descontração, por me fazerem rir em momentos de tristeza. Sem eles, a carga teria sido pesada demais para suportar sozinha.

“Feliz aquele que transfere o que
sabe e aprende o que ensina”

Cora Coralina

VIEIRA, N. M. G. **Estresse oxidativo seminal em cães**: estudo da susceptibilidade dos espermatozoides e possíveis terapias durante a criopreservação. 111 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

O desequilíbrio entre a capacidade antioxidante e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), também conhecido como estresse oxidativo (EO), pode ser extremamente prejudicial aos espermatozoides dos mamíferos. Essa célula é altamente susceptível ao EO devido ao seu citoplasma reduzido e consequente limitação na reserva antioxidante citoplasmática. Além disso, os espermatozoides exibem em sua membrana uma grande quantidade de ácidos graxos poli- insaturados (PUFAs), facilmente oxidadas e vulneráveis a peroxidação lipídica. Por outro lado, esses ácidos graxos, conferem fluidez a membrana plasmática, desempenhando um importante papel nos processos de fertilização além de proteger os espermatozoides durante a criopreservação. Com base nessas afirmações, adicionar ácidos graxos poli-insaturados na composição do diluente de sêmen canino para a criopreservação seria uma alternativa interessante. No entanto, parece plausível associar a esse diluente com PUFA um tratamento antioxidante para prevenir a exacerbada peroxidação lipídica. Portanto, o objetivo deste estudo foi associar o tratamento antioxidante com suplementação de PUFA, o ácido docosahexaenoico (DHA), ao diluidor para a criopreservação de sêmen canino. Para isso, foram desenvolvidos três experimentos visando a melhora da qualidade do sêmen criopreservado, utilizando-se em cada um deles, o sêmen de oito cães saudáveis e sexualmente maduros e avaliações das amostras para motilidade, membrana plasmática e integridade acrossômica, integridade do DNA, atividade e função mitocondrial e susceptibilidade da peroxidação lipídica. No primeiro estudo avaliou-se a susceptibilidade espermática a diferentes desafios de indução oxidativa (ânion superóxido [O_2^-], peróxido de hidrogênio [H_2O_2], radical hidroxil [$OH^\cdot$] e malondialdeído [MDA]) na presença ou ausência de plasma seminal (PS). Sêmen com PS teve função mitocondrial preservada contra EROs. No entanto, na ausência de PS, H_2O_2 reduziu o potencial da membrana mitocondrial. Além do mais, independentemente do PS, H_2O_2 foi deletério para a cinética espermática e para as membranas plasmática/acrossomal, e $OH^\cdot$ reduziu a atividade mitocondrial e aumentou a fragmentação do DNA. No entanto, amostras com PS foram mais resistentes para a peroxidação lipídica. O segundo estudo foi feito testando o DHA em três concentrações diferentes, para isso foi dividido em quatro grupos: controle, $1\mu M$ DHA, $5\mu M$ DHA e $10\mu M$ DHA. Foram adicionados ao diluidor de sêmen, em seguida congelados, descongelados e analisados. Foram constatadas diferenças significativas entre o grupo controle e $1\mu M$ DHA,

com este último apresentando menores valores para motilidade progressiva e espermatozoides rápidos e que o grupo 5 μ M DHA obteve menores valores de espermatozoides para espermatozoides estáticos comparando com todos os demais grupos. Desta forma, para o terceiro estudo selecionamos a concentração de 5 μ M DHA para associar com os antioxidantes catalase e vitamina E no diluidor (que combatem o radical OH $^{\cdot}$ e o H $_2$ O $_2$, respectivamente), baseando-se no primeiro e no segundo estudo. Os antioxidantes foram adicionados ao diluidor de sêmen e divididos em quatro grupos (todos contendo 5 μ M DHA): controle, vitamina E (0,6mM), catalase (300U/mL) e vitamina E (0,6mM) mais catalase (300U/mL). As amostras foram congelados, descongelados e avaliadas. Os resultados mostraram que o diluidor de sêmen canino contendo 5 μ M DHA mais vitamina E teve efeitos benéficos nas características cinéticas espermáticas, como velocidade média de percurso (VAP), velocidade linear (VSL), motilidade, motilidade progressiva e espermatozoides rápidos; enquanto 5 μ M DHA no diluidor, mais catalase não mostrou o efeito benéfico potencializado esperado, indicando que esse antioxidante parece ter toxicidade para o espermatozoide na concentração utilizada em nosso experimento. Finalmente, diluidor com 5 μ M DHA suplementado com vitamina E mais catalase, não aumentou a qualidade da cinética e estrutura espermáticas, mas melhorou a resistência ao estresse oxidativo. Concluimos que a suplementação do meio diluidor com DHA em associação com a vitamina E melhorou a qualidade espermática pós-descongelamento em sêmen criopreservado de cães.

Palavras-chave: Sêmen. Canino. Espécies reativas de oxigênio. Ácido graxo poli-insaturado. Antioxidante.

VIEIRA, N. M. G. **Seminal oxidative stress in dogs**: a study of spermatozoa susceptibility and possible therapies during sperm cryopreservation 111 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

The imbalance between the antioxidant capacity and the production of reactive oxygen species (ROS), also known as oxidative stress (EO), can be extremely harmful to mammalian sperm. This cell is highly susceptible to EO due to its reduced cytoplasm and consequent limitation on the enzymatic antioxidant reserve. In addition, sperm exhibit a large amount of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), which confer fluidity to the plasma membrane, playing an important role in the fertilization processes. Also, PUFAs are known to protect the sperm during the cryopreservation process. However, PUFAs are easily oxidized and vulnerable to lipid peroxidation. Based on these statements, adding polyunsaturated fatty acids in the canine semen diluent composition to cryopreservation would be an interesting therapy. However, it seems plausible to associate this diluent containing PUFA with an antioxidant treatment to prevent exacerbated lipid peroxidation. Therefore, the objective of this study was to associate the antioxidant treatment with docosahexaenoic acid (DHA) supplementation to the cryopreservation extender of canine semen. Towards this aim, three experiments were developed aiming to improve the quality of cryopreserved semen. For all the experiments, semen samples of eight healthy and sexually mature dogs were collected. Post-thaw semen evaluations consisted of motility, plasma and acrosome membrane integrity, DNA status, mitochondrial activity and function, and susceptibility of lipid peroxidation. In the first study, we aimed to assess which ROS is the most deleterious for canine semen in the absence of seminal plasma (condition required for the cryopreservation). This was performed in order to define the ideal antioxidant for semen cryopreservation. Therefore, semen samples were incubated with different oxidative induction challenges (superoxide anion [O_2^-], hydrogen peroxide [H_2O_2], hydroxyl radical [$OH^\cdot$] and malondialdehyde [MDA]) in the presence or absence of seminal plasma (PS). Semen with PS had a mitochondrial function preserved against ROS. However, in the absence of PS, H_2O_2 reduced the potential of the mitochondrial membrane. Moreover, regardless of the PS, H_2O_2 was deleterious for the sperm kinetics and for the plasmatic/acrossomal membranes, and $OH^\cdot$ reduced mitochondrial activity and increased DNA fragmentation. However, PS samples were more resistant to lipid peroxidation. The second study was performed by testing DHA in three different concentrations. Ejaculates were divided into four groups: control, 1 μ M, 5 μ M and 10 μ M DHA added to the semen extender. Samples were cryopreserved, thawed and analyzed. Significant differences were found between the control group and 1 μ M, with the latter presenting lower

values for progressive motility and rapid spermatozoa and the 5 μ M group showed lower values of static spermatozoa compared to all the other groups. Therefore, in the third experiment we selected the concentration of 5 μ M DHA to associate with the antioxidants catalase and vitamin E in the extender (specific for OH⁻ and the H₂O₂, respectively), based on the first and second studies. Antioxidants were added to the semen extender and divided into four groups (all containing 5 μ M DHA): control, vitamin E (0,6mM), catalase (300u/ML) and vitamin E (0,6mM) plus catalase (300u/ML). Samples were cryopreserved, thawed and evaluated. The results showed that canine extender containing 5 μ M of DHA plus vitamin E had beneficial effects on the sperm kinetic characteristics, such as mean route velocity (VAP), linear velocity (VSL), motility, progressive motility and percentage of rapid sperm, while 5 μ M of DHA in the diluent, plus catalase did not show the expected potentiated beneficial effect, indicating that this antioxidant appears to have sperm toxicity at the concentration used in our experiment. On the other hand, 5 μ M of DHA supplemented with vitamin E plus catalase, did not increase the quality of the kinetics and spermatid structure, but improved the resistance to oxidative stress. We concluded that the supplementation of the extender canine with DHA in association with vitamin E improved the post-thawing sperm quality in cryopreserved semen of dogs.

Keywords: Semen. Canine. Reactive oxygen species. Poly-unsaturated fatty acid. Antioxidant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Produção das espécies reativas de oxigênio	30
Figura 2 –	Reação de Fenton	32
Figura 3 –	Reação catalisadora: transforma duas moléculas de peróxido de hidrogênio em duas de água e uma de oxigênio (BENDICH, 1990)	37
Figura 4 –	Efeito das incubações (INC) com desafios oxidativos (Cont.: controle, O_2^- : ânion superóxido, H_2O_2 : peróxido de hidrogênio, $OH^\cdot$: radical hidroxil, e MDA: malondialdeído) e plasma seminal (PS; plasma seminal e sem plasma seminal) em alto (A- PS: $p < 0,0001$; INC: $p < 0,0001$; PS*INC: $p = 0,0006$), intermediário (B- PS: $p < 0,0001$; INC: $p = 0,0365$; PS*INC: $p = 0,0061$) e baixo (C- PS: $p < 0,0001$; INC: $p < 0,2$; PS*INC: $p = 0,009$) potencial de membrana plasmática (PMM) e susceptibilidade espermática a peroxidação lipídica (D- PS: $p < 0,0001$; INC: $p < 0,0001$; PS*INC: $p = 0,0025$; teste de TBARS) – São Paulo – 2018. ^{w,x} : letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos com plasma seminal ($p < 0,05$). A, B, C: letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos sem plasma seminal ($p < 0,05$) * indica diferenças estatísticas no mesmo tratamento com ou sem plasma seminal ($p < 0,05$)	56
Figura 5 –	Efeito dos desafios oxidativos (Cont.: controle, O_2^- : ânions superóxido, H_2O_2 : peróxido de hidrogênio, $OH^\cdot$: radical hidroxil, e MDA: malondialdeído) na motilidade total (A) e progressiva (B), fragmentação de DNA (SCSA, C) e prejuízos nas membranas acrossomal e plasmática (MLAL, D) – São Paulo – 2018. ^{a,b,c} : letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre tratamentos com plasma seminal ($p < 0,05$) .	57
Figura 6 –	Efeito dos desafios oxidativos (Cont.: controle, O_2^- : ânion superóxido, H_2O_2 : peróxido de hidrogênio, $OH^\cdot$: radical hidroxil, e MDA: malondialdeído) na atividade mitocondrial alta (A), média (B), baixa (C) e ausente (D) – São Paulo – 2018. ^{a,b,c} : diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos com plasma seminal ($p < 0,05$)	58
Figura 7 –	Delineamento do experimento 1	72
Figura 8 –	Delineamento do experimento 2	73
Figura 9 –	Movimento esquemático da célula espermática realizado pelo CASA (NICHII, 2009)	75

Figura 10 –	Efeito dos tratamentos nas análises computadorizadas de padrões cinéticos de espermatozoides caninos criopreservados com diferentes concentrações de DHA (Controle, DHA 1µM, 5µM e 10µM) em motilidade progressiva dos espermatozoides (A), espermatozoides rápidos (B), espermatozoides lentos (C) e espermatozoides estáticos (D) – São Paulo – 2018. ^{a,b} : letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos com DHA (p < 0,05)	80
Figura 11 –	Efeito dos tratamentos com diferentes concentrações de DHA (Controle, DHA 1µM, 5µM e 10µM) nas análises de estresse oxidativo em TBARS de sêmen canino criopreservado (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico) – São Paulo – 2018	82
Figura 12 –	Testes realizados nas amostras seminais criopreservadas de cães avaliadas pelo Sistema Computadorizado de Análise Espermática (CASA): velocidade média de percurso (A), velocidade linear (B), motilidade espermática total (C), motilidade espermática progressiva (D) e velocidade de movimento rápido do espermatozoide (E) – São Paulo – 2018. ^{a,b} : letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos com os antioxidantes (p < 0,05)	83
Figura 13 –	Efeito da suplementação com antioxidantes em amostras de sêmen de cão criopreservadas em diluidor contendo 5µM de DHA (Controle, Vitamina E, Catalase e Vit E + Cat: Vitamina E + Catalase) na atividade mitocondrial alta (A), média (B), baixa (C) e ausente (D) – São Paulo – 2018. ^{a,b} : letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos com os antioxidantes vitamina E, catalase e sua combinação (p < 0,05)	84
Figura 14 –	Status oxidativo das amostras de sêmen de cão criopreservadas em diluidor contendo 5µM DHA (Controle, Vitamina E, Catalase e Vit E: Vitamina E + Cat: Catalase), ENMI: Estresse oxidativo Negativo e Membrana plasmática Íntegra (A), EPML: Estresse oxidativo Positivo e Membrana plasmática Lesada (B), EPML: Estresse oxidativo Positivo e Membrana plasmática Íntegra (C), ENML: Estresse oxidativo Negativo e Membrana plasmática Lesada (D) e TBARS: Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (E) – São Paulo – 2018. ^{a,b} : letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos com os antioxidantes vitamina E, Catalase e sua combinação (p < 0,05)	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Efeito de probabilidade de incubação com diferentes espécies reativas de oxigênio e produto da peroxidação lipídica (O_2^- : ânion superóxido, H_2O_2 : peróxido de hidrogênio, OH^- : radical hidroxil, e MDA: malondialdeído) e interação do plasma seminal (incubação x plasma seminal) nos atributos espermáticos, padrões cinéticos e status oxidativo – São Paulo – 2018	55
Tabela 2 –	Efeito das diferentes concentrações do ácido docosahexaenoico (DHA), nas variáveis de cinética espermática de amostras criopreservados de caninos – São Paulo – 2018	81
Tabela 3 –	Efeito das diferentes concentrações do ácido docosahexaenoico (DHA) em resposta aos testes funcionais de atividade mitocondrial, potencial de membrana mitocondrial e de integridade das membranas plasmática e acrossomal de sêmen canino submetido à criopreservação – São Paulo – 2018	81
Tabela 4 –	Efeito dos tratamentos antioxidantes vitamina E, catalase e a combinação de ambos em resposta aos testes funcionais de atividade mitocondrial, potencial de membrana mitocondrial e de integridade das membranas plasmática e acrossomal de sêmen canino submetido à criopreservação em diluidor contendo DHA– São Paulo – 2018	85
Tabela 5 –	Efeito dos tratamentos antioxidantes (Controle, vitamina E, catalase e vitamina E mais catalase) nas variáveis de status oxidativo das amostras de sêmen de cão criopreservadas em diluidor contendo DHA – São Paulo – 2018	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
®	Marca registrada
<	Menor que
BSA-EFAF	<i>Bovine Serum Albumin – Essentially Free of Fatt Acids</i>
CASA	<i>Computer Assited Sperm Analysis</i>
Cu ⁺⁺	Cobre
DAB	3,3 diaminobenzidina
DHA	Ácido decosahecanoico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPBS	<i>Dulbecco's phophate-buffered saline</i>
EDTA	Etilenodiaminotetracético
ENMI	Estresse oxidativo Negativo e Membrana plasmática Íntegra
ENML	Estresse oxidativo Negativo e Membrana plasmática Lesada
EPMI	Estresse oxidativo Positivo e Membrana plasmática Íntegra
EPML	Estresse oxidativo Positivo e Membrana plasmática Lesada
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
Fe ⁺⁺	Ferro
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FITC-PSA	<i>Fluorescein isothiocyanate – Pisum sativum agglutinin</i>
g	Força gravitacional
GPx	Glutationa peroxidase
GSH	Glutationa
H ₂ O	Molécula de água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
JC-1	5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-201cloreto de tetraetil-benzimidazolilcarbocianina
Kg	Quilograma
M	Molar
MDA	Malondialdeído
mL	Mililitro
mM	Milimolar
N	Número de amostragem

NaCl	Cloreto de sódio
NADH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>
NADPH	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NaOH	Hidróxido de sódio
ng	Nanogramas
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
°C	Graus <i>Celsius</i>
OH ⁻	Radical hidroxila
p	Nível de significância
PBS	Solução tampão de fosfato
pH	Potencial hidrogênio iônico
PI	<i>Iodeto propidium</i>
PUFA	<i>Polynsaturated fatty acid</i>
qsp	Quantidade suficiente para
SOD	Superóxido dismutase
Sptz	Espermatozoides
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúricos
TNE	Tampão Tris-HCl, NaCl, EDTA
UI	Unidade internacional
α	Alfa
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
2	CAPÍTULO 1: Revisão de literatura	26
2.1	BIOTECNOLOGIAS DA REPRODUÇÃO EM CÃES	26
2.2	CRIOPRESERVAÇÃO ESPERMÁTICA EM CÃES	26
2.3	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS), ANTIOXIDANTES E ESTRESSE OXIDATIVO (EO)	29
2.3.1	Ânion superóxido ou radical superóxido (O_2^-)	30
2.3.2	Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	31
2.3.3	Radical hidroxila ($OH^\cdot$)	31
2.3.4	Malondialdeído (MDA)	32
2.4	ANTIOXIDANTES	33
2.5	TRATAMENTO ANTIOXIDANTE DURANTE A CRIOPRESERVAÇÃO ..	34
2.5.1	Catalase	36
2.5.2	Vitamina E	38
2.6	ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS (<i>Polyunsaturated Fatty Acids – PUFAs</i>)	39
3	HIPÓTESE	42
4	OBJETIVOS	44
5	CAPÍTULO 2: Indução do estresse oxidativo espermático em cães: susceptibilidade contra diferentes espécies reativas de oxigênio e função protetora do plasma seminal	46
5.1	INTRODUÇÃO	47
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS	48
5.2.1	Animais	48
5.2.2	Delineamento experimental	49
5.2.3	Coleta e processamento do sêmen	49
5.2.4	Desafios oxidativos <i>in vitro</i>	50
5.2.5	Análise espermática	51
5.2.5.1	Análise computadorizada dos padrões de cinética espermática	51
5.2.5.2	Testes funcionais espermáticos	51
5.2.5.3	Avaliação da resistência espermática ao estresse oxidativo	53
5.2.6	Análise estatística	53
5.3	RESULTADOS	54

5.4	DISCUSSÃO	58
	REFERÊNCIAS	62
6	CAPÍTULO 3: Efeito dos antioxidantes não enzimáticos (vitamina E) e enzimático (catalase) em amostras de sêmen canino criopreservadas em diluidor contendo DHA	67
6.1	INTRODUÇÃO	68
6.2	MATERIAIS E MÉTODOS	71
6.2.1	Animais	71
6.2.2	Delineamento experimental	71
6.2.2.1	Experimento 1: Efeito da suplementação com ácido graxo poli-insaturado, ácido docosahexaenoico (DHA), no diluidor de sêmen canino	71
6.2.2.2	Experimento 2: Efeito da suplementação com antioxidantes (vitamina E e catalase) em amostras de sêmen canino criopreservadas em diluidor contendo DHA	72
6.2.3	Coleta, criopreservação e descongelamento seminal	73
6.2.4	Avaliação espermática pós-descongelamento	74
6.2.4.1	Análise computadorizada dos padrões de cinética espermática	74
6.2.4.2	Testes funcionais espermáticos	75
6.2.4.3	Avaliação da resistência espermática ao estresse oxidativo	77
6.2.5	Análise estatística	78
6.3	RESULTADOS	79
6.3.1	Experimento 1	79
6.3.2	Experimento 2	82
6.4	DISCUSSÃO	87
	REFERÊNCIAS	94
7	CONCLUSÕES	101
	REFERÊNCIAS	103

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (ABINPET), o Brasil possui uma população de 132,4 milhões de animais de estimação, dos quais 52,2 milhões são de cães. Estes números levaram o Mercado Pet Brasileiro a um faturamento total, em 2016, de R\$ 18,9 bilhões, com um crescimento de 7,9% em 2017 (ABINPET, 2018).

Os cães domésticos (*Canis lupus familiaris*) foram uma das primeiras espécies a serem domesticadas pelo homem há pelo menos 14.000 anos (BUNYAGA et al., 2018). Os mais antigos esqueletos de cães eram sempre encontrados próximos aos acampamentos de humanos cerca de 30.000 anos após o aparecimento do *Homo sapiens sapiens* (GRANDJEAN; VAISSAIRE, 2001). Os cães são utilizados para diversas finalidades: caçadores, guardiões, pastores, cães-guia para cegos, cães de serviço e de audição, cães de resgate e cães para propósitos policiais e militares, como na detecção de drogas e explosivos. No entanto, a maioria deles são de companhia. A grande variedade do uso de cães para diferentes propósitos e a seleção pelos humanos, tiveram resultados na grande diversidade desses animais, no que se diz respeito à aparência e comportamento (BUNYAGA et al., 2018).

Neste cenário, é notória a importância que os cães desempenham na sociedade humana e seu impacto na economia global (JANG; KIM; LEE, 2010). Além disso, semelhanças entre cães, canídeos silvestres e seres humanos caracterizam o cão como modelo experimental ideal (BUNYAGA et al., 2018; KIRCHHOFF, 2002; THOMASSEN; FARSTAD, 2009) estimulando novos avanços nas biotecnologias reprodutivas caninas, como inseminação artificial e criopreservação espermática (THOMASSEN; FARSTAD, 2009), também muito utilizada na reprodução de canídeos silvestres ameaçados de extinção (BUNYAGA et al., 2018). A criopreservação do sêmen permite preservar, a longo prazo, animais de grande importância zootécnica e disseminar seu material genético mesmo *post mortem* (THOMASSEN; FARSTAD, 2009), uma vez que ainda em poucas raças é utilizada a inseminação artificial (BUNYAGA et al., 2018).

No entanto, sabe-se que o processo de criopreservação espermática reduz a sobrevivência celular, podendo promover perda de integridade das membranas dos

espermatozoides, diminuição da motilidade e aumento dos danos de DNA (LUCIO et al., 2016a; WAKAMATSU et al., 2013). Esses efeitos, direta ou indiretamente, estão relacionados à maior produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) pelos espermatozoides (LUCIO et al., 2016a). As EROs desempenham um papel importante na fisiologia do espermatozoide, em processos fundamentais como a capacitação, a hiperativação, a reação acrossomal e a penetração do espermatozoide no oócito (LAMIRANDE et al., 1997). Por outro lado, o desequilíbrio entre a produção de EROs e a defesa antioxidante celular, ocasiona o estresse oxidativo espermático, levando à perda da funcionalidade espermática (GRIVEAU; LANNOU, 1997; LAMIRANDE et al., 1997). Além da condição oxidativa promovida pelo processo de criopreservação, durante este procedimento é necessária a remoção do plasma seminal (ALCANTAR-RODRIGUEZ; MEDRANO, 2017), fluido rico em antioxidantes, podendo exacerbar o desequilíbrio oxidativo espermático (FARSTAD, 2009).

Ademais, os espermatozoides são particularmente susceptíveis ao ataque das EROs devido ao seu citoplasma reduzido e, conseqüentemente, pela quantidade limitada de antioxidante enzimático (AITKEN; SAWYER, 2003). Além disso, a membrana do espermatozoide é rica em ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), o que o torna mais suscetível ao estresse oxidativo, devido às suas ligações duplas serem mais facilmente clivadas pelas EROs (NICHII et al., 2007). No entanto, os PUFAS também estão envolvidos na proteção da membrana do espermatozoide durante o processo de criopreservação e, dessa forma, podem melhorar a capacidade fecundante dos espermatozoides (AGARWAL; GUPTA; SIKKA, 2006; ROOKE; SHAO; SPEAKE, 2001). Portanto, adicionar PUFAs na composição do diluente de sêmen canino para a criopreservação pode ser uma alternativa para manter a viabilidade espermática pós-descongelamento. No entanto, para combater a peroxidação lipídica exacerbada causada pela adição desses ácidos graxos, parece plausível associar essa suplementação com antioxidantes (STRZEZEK; KOZIOROWSKA-GILUN; STAWISZYŃSKA, 2012). Além disso, a adição de antioxidantes pode contribuir para proteger os espermatozoides contra danos oxidativos causados pelo aumento na produção de EROs durante a criopreservação (BECCAGLIA et al., 2009; LUCIO et al., 2016b). Diversos estudos foram realizados com o objetivo de avaliar o efeito dos antioxidantes na criopreservação do sêmen com resultados contraditórios (LUCIO et al., 2016b; MICHAEL et al., 2007; MONTEIRO et al., 2009; NEAGU et al., 2010; STRZEZEK; KOZIOROWSKA-GILUN; STAWISZYŃSKA, 2012). Uma das possíveis razões para esses resultados

controversos é o uso do antioxidante inadequado. Cada espécie reativa de oxigênio é susceptível a um diferente antioxidante (AGARWAL; DURAIRAJANAYAGAM; DUPLESSIS, 2014; OPUWARI; HENKEL, 2016). Desse modo, quando a suplementação inadequada de antioxidante é utilizada, esse tratamento pode levar a resultados deletérios por prejudicar eventos fisiológicos dependentes da oxidação (NICHII, 2009). Portanto, escolher o antioxidante ideal através da identificação das espécies reativas de oxigênio mais deletérias, pode ser uma abordagem interessante.

CAPÍTULO 1

2 CAPÍTULO 1: Revisão de literatura

2.1 BIOTECNOLOGIAS DA REPRODUÇÃO EM CÃES

As biotecnologias do sêmen são processos-chave nas técnicas de reprodução assistida. Dentre as biotecnologias conhecidas, existem a refrigeração e a criopreservação espermática, que é uma área de crescente interesse e apresenta vantagens logísticas de transporte resguardando também os animais do estresse causado pelo transporte, evita custos e acidentes durante o deslocamento de animais, e evita o risco de exposição às doenças infectocontagiosas durante a monta natural (MICHAEL et al., 2007; SILVA, 2007; SILVA; CARDOSO; SILVA, 2000). Além disso, a criopreservação é uma potencial ferramenta no armazenamento espermático por períodos indeterminados, disseminação de material genético para seleção de linhagens e desempenho desejados, permite a preservação e propagação de material genético *post mortem*, além de ser a biotécnica reprodutiva utilizada para canídeos silvestres, no qual o cão doméstico é modelo biológico (LÚCIO, 2012; SILVA, 2007).

A refrigeração do sêmen tem sido uma boa opção por ser um método barato, prático e por promover maiores taxas de sobrevivência espermática em comparação à criopreservação. Por outro lado, a refrigeração espermática mantém a viabilidade dos espermatozoides durante curtos períodos de tempo (ALVARENGA et al., 2013). Desta forma, diversas pesquisas vem sendo realizadas objetivando melhorar o processo de criopreservação, com o intuito de implementar o uso rotineiro desta biotecnologia em técnicas de reprodução assistida em cães.

2.2 CRIOPRESERVAÇÃO ESPERMÁTICA EM CÃES

As biotecnologias reprodutivas aplicada em cães possui desenvolvimento lento e discreto, quando comparadas às outras espécies. A primeira vez que o espermatozoide de cão foi descrito microscopicamente, foi em 1672 por Leewenhoek. Em 1780, Spallanzani realizou a primeira inseminação artificial com sêmen *in natura*, o que levou ao nascimento de 3

filhotes vivos e normais (SOUZA, 1985). No entanto, somente em 1969, que relatou-se pela primeira vez nascimentos oriundos de inseminação artificial utilizando-se sêmen criopreservado (SEAGER, 1986).

A criopreservação espermática é um método para preservar material genético e manter a diversidade genética em várias espécies, inclusive nos cães. Essa técnica aumenta o tempo de armazenamento e facilita o transporte de sêmen para grandes distâncias (BUNYAGA et al., 2018). No entanto, espermatozoides criopreservados de cães possuem acentuada redução da capacidade fecundante após o descongelamento, combinado com a dificuldade de determinar o momento ideal da inseminação e a necessidade dessa inseminação ser por via intrauterina (LONE et al., 2018; MICHAEL et al., 2007), que é uma técnica de difícil cateterização em cadelas por possuírem angulação ventral da cérvix, estreitamento da região paracervical, prega dorsal da cérvix e longo comprimento vaginal (ENGLAND; VERSTEGEN, 1996) podendo ser cirúrgica ou transcervical endoscópica. Os índices de concepção dependem da qualidade do sêmen canino pós-descongelamento, e são geralmente inferiores, quando comparados com sêmen fresco (LONE et al., 2018; MICHAEL et al., 2007).

Todo o processo de criopreservação, como diluição, resfriamento, congelamento e descongelamento, influencia a qualidade espermática, diminuindo a capacidade de fertilização do espermatozoide para a inseminação artificial (LECEWICZ et al., 2018). Alguns autores (BUNYAGA et al., 2018; THURSTON et al., 2001) mostraram a existência de variações nas propriedades da membrana espermática entre indivíduos, dentro de uma mesma espécie, que podem ter sensibilidades diferentes ao processo de congelamento, ou seja, a variação entre animais da mesma espécie na congelabilidade espermática existe e é determinada geneticamente. Embora ainda existam poucos estudos sobre mecanismos moleculares que levam o espermatozoide à morte durante a criopreservação, recentemente demonstrou-se que alterações semelhantes às encontradas em células apoptóticas estão envolvidas, já descritas em algumas espécies, como equinos, bovinos e humanos (PRETE et al., 2018).

As propriedades osmóticas dos gametas, as taxas de resfriamento e aquecimento, e a formação de cristais de gelo intracelulares, são os principais fatores que influenciam a sobrevivência do espermatozoide à criopreservação. Como as atividades das células espermáticas funcionam através de uma perfeita regulação osmótica, a capacidade de resposta dos espermatozoides aos desafios osmóticos e a habilidade de regular o volume celular é

crítica durante a criopreservação (BUNYAGA et al., 2018). Durante a criopreservação, quando a temperatura chega abaixo de 0°C, cristais de gelo começam a se formar externamente à célula. Com essa mudança de temperatura, devido ao grande aumento na osmolaridade, os espermatozoides presentes no líquido remanescente são submetidos ao estresse osmótico extremo (KAWAI, 2017). Quando esse líquido remanescente congela, os cristais de gelo são intercalados com canais não congelados de solutos altamente concentrados. Os espermatozoides ficam nesses canais, em ambiente hiperosmótico, e encolhem-se, pois ocorre perda da água (desidratação). Se a temperatura diminui adequadamente, os canais permanecem o tempo necessário, até que a maioria dos processos bioquímicos e biofísicos acabem; mas se a congelação é rápida, a água intracelular pode congelar em cristais de gelo, antes que a água possa sair da célula, podendo danificá-la (LOOMIS; GRAHAM, 2008). A velocidade da taxa de refrigeração na criopreservação é muito importante, pois quando esta taxa é lenta, a maioria dos espermatozoides permanece funcional após o descongelamento. Assim, a velocidade de congelamento deve ser lenta o suficiente para permitir que as células minimizem o potencial químico e os gradientes de osmolaridade, através da membrana plasmática, mas rápido o suficiente para desidratar a célula, sem expô-la a concentrações salinas letais (BUNYAGA et al., 2018; LOOMIS; GRAHAM, 2008).

As alterações físico-químicas supracitadas, direta ou indiretamente, promovem maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) durante o processo de criopreservação, podendo ocasionar o desequilíbrio oxidativo espermático. As EROs, produtos do metabolismo do oxigênio, estão presentes em eventos patológicos e fisiológicos celulares. Tais eventos serão abordados nos tópicos a seguir.

A centrifugação do sêmen é utilizada em diferentes técnicas de criopreservação em algumas espécies, como na canina. Esse processo é realizado para remover o excesso de fluido prostático, que age de forma negativa na motilidade e vitalidade dos espermatozoides submetidos ao congelamento/descongelamento e, para padronizar a diluição do sêmen na concentração final de espermatozoide e de glicerol (BUNYAGA et al., 2018). Além do estresse físico causado pelo processo, a principal desvantagem de centrifugar o sêmen para a criopreservação, é a eliminação dos antioxidantes naturais presentes no plasma seminal (BUNYAGA et al., 2018; SRTZEZEK et al., 2009). A função do antioxidante no plasma seminal é fundamental para o equilíbrio entre a produção de radicais livres e a atividade oxidante (KAWAI, 2017; TUFARELLI et al., 2018). Além da proteção existente no plasma

seminal, os espermatozoides caninos também possuem enzimas antioxidantes intracelulares, como catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase, como forma de proteção contra os efeitos citotóxicos das EROs (SRTZEZEK et al., 2009). No entanto, o volume de citoplasma escasso da célula espermática, limita sua capacidade antioxidante (AITKEN et al., 1996; LÚCIO, 2012; NICHI, 2009).

2.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs), ANTIOXIDANTES E ESTRESSE OXIDATIVO (EO)

No meio científico, os termos radicais livres (RL), oxidantes e espécies reativas do metabolismo do oxigênio (EROs), são usados para identificar os intermediários químicos reativos originários desse metabolismo do oxigênio, ou seja, os subprodutos do metabolismo aeróbico (MAIA et al., 2009). Dependendo da concentração desses metabólitos, pode caracterizar-se um quadro de estresse oxidativo. Este termo, geralmente, é utilizado quando a concentração de oxidantes ultrapassa o de antioxidantes (AITKEN, 1994). Isso ocorre quando a molécula de oxigênio sofre uma reação tetravalente, por meio de oxirreduções, formando água como produto final (NORDBERG; ARNÉR, 2001). Os RL possuem um elétron não pareado, ocupando uma órbita externa. Já as EROs, não necessariamente possuem elétrons desapareados, no entanto, são moléculas decorrentes do metabolismo do oxigênio (LOPES, 2010).

Em condições aeróbicas, a produção de EROs é um evento fisiológico, sendo que, estes metabólitos são essenciais para o funcionamento das células, geralmente atuando como gatilhos fisiológicos (GARRIDO et al., 2004). A célula espermática é capaz de produzir e degradar as EROs, as quais, em pequenas quantidades, são necessárias em eventos fisiológicos relacionados aos processos de fecundação (AITKEN, 2017; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; MAIA et al., 2009; PRETE et al., 2018). Tais eventos envolvem a regulação da taxa de hiperativação, reação acrossomal e interação espermatozoide-oócito (AITKEN; IRVINE; WU, 1991; GRIVEAU; LE LANNOU, 1994; LAMIRANDE et al., 1997). Desta forma, os espermatozoides possuem sistemas sensivelmente regulados para manter EROs em concentrações basais, onde sua produção e eliminação são precisamente

balanceadas (LUSHCHAK, 2014).

Dessa forma, temos o paradoxo referido por vários autores: o processo mais primordial para permitir a vida das células eucarióticas (a fosforilação oxidativa) é também um dos principais responsáveis pela produção de espécies reativas de oxigênio (Figura 1, ANDRADE et al., 2010). Dentre as principais EROs formadas, tem-se: ânion superóxido ou radical superóxido (O_2^-); peróxido de hidrogênio ou água oxigenada (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH^\cdot$) (AGARWAL; GUPTA; SHARMA, 2005; ANDRADE et al., 2010). Além das EROs, existem produtos de oxidação formados pela ação destas moléculas, como por exemplo, os produtos da peroxidação lipídica. Dentre estes produtos, ganha-se destaque a molécula denominada malondialdeído (MDA), tão deletéria quanto as EROs (MONTJEAN et al., 2010).

Figura 1. Produção de espécies reativas de oxigênio

2.3.1 Ânion superóxido ou radical superóxido (O_2^-)

O ânion superóxido é a primeira ERO formada espontaneamente, a partir da ligação de um elétron ao oxigênio molecular. Assim, o processo de sua formação ocorre quando a molécula de oxigênio não é completamente reduzida a duas moléculas de água. Se o oxigênio for parcialmente reduzido, ou seja, receber apenas um elétron de forma espontânea, forma-se o radical superóxido (GATÉ et al., 1999). Em quase todas as células aeróbicas sua formação ocorre espontaneamente, principalmente na membrana das mitocôndrias, através da cadeia respiratória e também por flavoenzimas, lipoxigenases e ciclooxigenases. (ANDRADE

et al., 2010; MAIA et al., 2009; NORDBERG; ARNÉR, 2001). É um radical pouco reativo que não penetra as membranas lipídicas, agindo apenas na região onde é produzido (AGUIAR; FERRAZ, 2007; SOBRINHO, 2009). Sofre rápida dismutação espontânea ou ação enzimática da superóxido dismutase dando origem ao H_2O_2 (KAWAI, 2017).

2.3.2 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Segundo alguns estudos, o peróxido de hidrogênio pode ser considerado uma das EROs mais tóxicas (AITKEN; BUCKINGHAM; HARKISS, 1993; GRIVEAU et al., 1995). Isso ocorre pois, embora seja menos reativo que o ânion superóxido, é mais altamente difusível devido à sua habilidade em atravessar a membrana plasmática livremente e de inibir as atividades enzimáticas das funções celulares, diminuindo, desta forma, as defesas antioxidantes dos espermatozoides (GATÉ et al., 1999; GRIVEAU et al., 1995; MICHAEL et al., 2007). A formação do peróxido de hidrogênio ocorre quando a molécula de oxigênio recebe somente dois elétrons ao invés de quatro, e com isso também é parcialmente reduzido como o radical superóxido (GATÉ et al., 1999).

O H_2O_2 não é um radical livre, porém é um produto do metabolismo do oxigênio extremamente deletério por participar como intermediário na reação que produz o radical hidroxila (MAIA et al., 2009; NORDBERG; ARNÉR, 2001). O peróxido de hidrogênio tem vida curta e é menos reativo que o ânion superóxido (GATÉ et al., 1999).

2.3.3 Radical hidroxila ($OH^\cdot$)

O radical hidroxila é gerado através da Reação de Fenton (Figura 2), a partir do H_2O_2 em excesso, que é catalisado por metais de transição, como por exemplo, ferro e cobre. É a molécula mais altamente reativa em sistemas biológicos, e reage rápido com estruturas que estão próximas, atacando moléculas orgânicas pela abstração de hidrogênio como as

outras EROs (AGUIAR; FERRAZ, 2007; GATÉ et al., 1999; NORDBERG; ARNÉR, 2001). O radical hidroxila também pode dar início à oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares (lipoperoxidação). Além disso, também é responsável por causar danos aos ácidos nucleicos, carboidratos, proteínas e lipídeos quando há desequilíbrio oxidativo, podendo levar à morte celular e alterar os sistemas enzimáticos intracelulares (SILVA; GUERRA, 2010).

Figura 2. Reação de Fenton

2.3.4 Malondialdeído (MDA)

O malondialdeído, subproduto do ataque das EROs a lipídeos, possui alta reatividade, longevidade e age dentro e fora das células, interagindo com biomoléculas, como ácidos nucleicos e proteínas, causando danos irreversíveis aos espermatozoides (KAWAI, 2017). Com a decomposição dos hidroperóxidos lipídicos na membrana do espermatozoide durante a lipoperoxidação, ocorre a formação do malondialdeído (MDA), um aldeído de cadeia curta (MONTJEAN et al., 2010; SOBRINHO, 2009). A concentração desse subproduto é utilizada para mensurar a intensidade da peroxidação lipídica em sistemas biológicos, células e tecidos pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBARS). O MDA pode ser tão ou mais deletério que as EROs por possuírem meia vida maior (BONNES-TAOUREL; GUÉRIN; TORREILLES, 1992; KAWAI, 2017; MAIA et al., 2009; MONTJEAN et al., 2010; ROCHA et al., 2018), causando redução na motilidade, fragmentação de DNA e comprometimento da ligação do espermatozoide ao oócito, o que resulta na infertilidade (ROCHA et al., 2018). Segundo alguns estudos, o MDA está relacionado ainda com o envelhecimento e doenças degenerativas (MONTJEAN et al., 2010).

2.4 ANTIOXIDANTES

O mecanismo de ação das EROs na fisiologia normal dos espermatozoides, provavelmente está diretamente ligado a regulação da taxa de hiperativação, para a ocorrência de reação acrossômica e para a fusão espermatozoide/oócito (AITKEN, 2017; LAMIRANDE et al., 1997). Desta forma, o objetivo dos tratamentos com antioxidantes deve evitar a completa eliminação de EROs para não influenciar negativamente em seu papel fundamental na fisiologia das funções espermáticas dos mamíferos.

Os antioxidantes podem ser divididos em três categorias, de acordo com a forma como agem:

- a primeira, são inibidores preventivos que sequestram as EROs, impedindo sua interação com os alvos celulares, ou retardam a fase de iniciação, impedindo a geração de espécies reativas;
- a segunda, são bloqueadores da etapa de propagação da cadeia radicalar, que removem os radicais intermediários de fato e;
- a terceira, são de reparo do DNA, proteases e fosfolipases (DNA, proteína e lipídios), que removem as lesões oxidativas.

Os antioxidantes podem ser enzimáticos (catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase) ou não enzimáticos (glutathione reduzida, ubiquinona, ácido úrico, bilirrubina, NADPH e NADH, falonóides, vitaminas E e C, betacaroteno, licopeno) (JORDÃO JÚNIOR et al., 1998; MICHAEL et al., 2007; PRETE et al., 2018; SOUZA; MORAIS; TONIOLLI, 2018)

O controle da concentração de radicais livres do sêmen é realizado pelos antioxidantes endógenos, do plasma seminal e do espermatozoide, que são capazes de neutralizar as EROs (LECEWICZ et al., 2018b; LÚCIO, 2012), evitando a sobrecarga e preservando a qualidade do sêmen (LONE et al., 2018; PRETE et al., 2018). Certos antioxidantes podem ser eficazes após o descongelamento, por reduzir o impacto do estresse oxidativo nessa fase (MICHAEL et al., 2007). Teoricamente, os antioxidantes podem estender a fase de iniciação ou então inibir a fase de propagação da oxidação, mas não podem prevenir completamente (JORDÃO JÚNIOR et al., 1998), o que é bom, pois se houvesse a eliminação completa das EROs, as funções dos gametas masculinos estariam comprometidas.

As EROs são prejudiciais ao organismo quando ocorre aumento exacerbado em sua produção ou quando há diminuição de agentes antioxidantes (ANDRADE et al., 2010; DOWLING; SIMMONS, 2009; GATÉ et al., 1999; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; PRETE et al., 2018). Elas causam danos aos lipídios, proteínas, carboidratos e ao material genético; levando a perdas irreversíveis da cinética do espermatozoide, redução da fusão espermatozoide/oócito, alteração do citoesqueleto e danos ao DNA (NICHII, 2009; PRETE et al., 2018). O choque frio e os danos causado pela congelação estão associados ao excesso das EROs e à geração do estresse oxidativo. A perda da qualidade do sêmen após a criopreservação durante o processo de resfriamento, congelamento e descongelamento, levam ao estresse físico e químico na estrutura do espermatozoide, reduzindo a viabilidade e a capacidade de fecundar (WANG et al., 1997). Uma alternativa para melhorar a qualidade espermática seria realizar um tratamento antioxidante durante o processo de criopreservação.

Apesar dos mecanismos antioxidantes supracitados, quando ocorre um desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade antioxidante, ocorre o fenômeno denominado estresse oxidativo. Em relação aos espermatozoides, diversos fatores podem levar ao estresse oxidativo espermático (NICHII, 2009). Assim como citado anteriormente, a criopreservação é uma biotecnologia que promove diversas alterações físico-químicas, que direta ou indiretamente, ocasiona o estresse oxidativo espermático (CHATTERJEE; DE LAMIRANDE; GAGNON, 2001; WANG et al., 1997), provavelmente devido às disfunções mitocondriais. Ademais, estudos tem demonstrado uma redução da capacidade antioxidante seminal durante a criopreservação. Além disso, durante a criopreservação espermática em cães, é necessário a remoção do plasma seminal, conteúdo rico em antioxidantes, exacerbando o desequilíbrio oxidativo espermático. Desta forma, estudos têm sugerido um tratamento antioxidante durante o processo de criopreservação, com o intuito de prevenir crioinjúrias oxidativas relacionadas a este processo.

2.5 TRATAMENTO ANTIOXIDANTE DURANTE A CRIOPRESREVAÇÃO

Antioxidante é a substância capaz de diminuir ou inibir a oxidação, mesmo presente em baixas concentrações comparada ao seu substrato, ou seja, são compostos que protegem os sistemas biológicos contra os efeitos deletérios dos processos ou das reações que

levam à oxidação de estruturas celulares (JORDÃO JÚNIOR et al., 1998). Muitos estudos foram realizados com o objetivo de avaliar o efeito dos antioxidantes na criopreservação do sêmen de cães com resultados contraditórios (LUCIO et al., 2016b; MICHAEL et al., 2007; MONTEIRO et al., 2009; NEAGU et al., 2010; SRTZEZEK et al., 2009). Alguns autores apresentaram resultados positivos acrescentando antioxidantes no diluidor de sêmen canino para a criopreservação, como Lecewicz et al., (2018), Lopes (2010) e Michael et al., (2007). Outros obtiveram resultados limitados ou nulos, como Dad et al., (2006) e Sobrinho (2009) e, outros ainda, como Angrimani et al., (2018) e Lúcio (2012), descreveram efeito tóxico dose-dependente.

Estes resultados contraditórios ao usar antioxidantes na criopreservação espermática, podem estar relacionados à conduta que esta terapia foi estabelecida. Para que uma terapia antioxidante seja efetiva, diversos fatores devem ser levados em consideração, basicamente podemos dividi-los em quatro requisitos a seguir:

Primeiramente, para que o tratamento antioxidante seja eficiente é necessário que o sistema biológico em questão esteja sob estresse oxidativo, pois se isso não estiver ocorrendo, um tratamento antioxidante, mesmo em concentrações baixas, podem não ser eficientes ou até mesmo deletérias, já que as EROs possuem papel fisiológico fundamental para o espermatozoide (SOBRINHO, 2009).

Em segundo lugar, previamente a um tratamento antioxidante, é essencial detectar a ERO a qual o espermatozoide de determinada espécie ou em determinadas situações é mais susceptível, com o objetivo de realizar um tratamento antioxidante direcionado à eliminação de tal ERO, já que diferentes antioxidantes (enzimáticos e não enzimáticos) possuem especificidade por determinada ERO. Em um estudo realizado constatou-se que o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila foram as EROs mais nocivas para o espermatozoide canino (VIEIRA et al., 2018).

Em terceiro lugar, o estresse oxidativo provavelmente afeta várias estruturas das células espermáticas de forma diferente, e também pode haver variação de espécie para espécie (PEÑA et al., 2003). Vieira et al., (2018) referiram que cada ERO foi mais deletéria para uma estrutura espermática diferente e sugeriram que, para um tratamento antioxidante em espermatozoide de cães ser eficiente, seria necessário uma associação entre antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que debelassem as EROs mais deletérias sob situação de indução do estresse oxidativo para a espécie: H_2O_2 e $OH^\cdot$. A catalase e a vitamina E, são

exemplos de antioxidantes extremamente eficazes em debelar o peróxido de hidrogênio (NORDBERG; ARNÉR, 2001) e o radical hidroxila (BJORNEBOE; BJORNEBOE; DREVON, 1990; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1985), respectivamente. Sob situação de indução do estresse oxidativo, o H_2O_2 reduziu dramaticamente o potencial da membrana mitocondrial, foi deletério para a cinética espermática (motilidade total e progressiva) e para as membranas plasmática/acrossomal, e o $OH^\cdot$ reduziu a atividade mitocondrial e aumentou a fragmentação de DNA. Dessa forma, em alguns casos, como em nosso trabalho, sugeriu-se a terapia de antioxidante enzimático, como a glutathione peroxidase/redutase ou catalase, associada a antioxidantes não enzimáticos como o α -tocoferol ou ácido ascórbico, para combater as duas EROs mais deletérias ao sêmen canino (VIEIRA et al., 2018).

Por fim, a quantidade de antioxidante utilizada em cada experimento pode ser a causa dos resultados controversos, tanto negativos quanto positivos, para o tratamento de diluidores de sêmen nas amostras espermáticas. Esse fator poderia incrementar de forma significativa a qualidade espermática, evitando os danos causados pelas EROs, conforme sinalizado por Nichi, (2009). As espécies reativas de oxigênio atuam como mediadoras das funções normais dos espermatozoides, quando encontradas em baixas concentrações, mas são altamente tóxicas quando produzidas em excesso (MICHAEL et al., 2007). Portanto, uma quantidade ideal poderia melhorar significativamente a qualidade espermática, evitando os efeitos deletérios causado pelas EROs (LOSANO et al., 2018).

2.5.1 Catalase

A catalase se localiza, principalmente, no peroxissomos das células dos mamíferos, e é uma das enzimas mais eficientes. Ela age como catalisadora da reação que transforma duas moléculas de água oxigenada em duas moléculas de água mais uma de oxigênio (Figura 3; BAKER et al., 1996; BENDICH, 1990), o que evita a formação do radical hidroxila, que é a espécie reativa de oxigênio mais prejudicial ao espermatozoide (HALLIWELL, 1991).

Figura 3. Reação catalisadora: transforma duas moléculas de peróxido de hidrogênio em duas de água e uma de oxigênio (BENDICH, 1990).

Uma de suas principais vantagens é não ser saturada por concentrações do seu substrato e, por isso, exerce um importante papel na tolerância ao estresse oxidativo, mesmo não estando presente em todos os tipos celulares (MATÉS; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, 2000). A catalase age como um antioxidante primário, ou seja, inibidores preventivos (JORDÃO JÚNIOR et al., 1998).

Muitos agentes antioxidantes como vitamina E e C, catalase, dimetilsulfóxido, taurina, hipotaurina e N-acetilcisteína já foram testadas em estudos (ANDERSEN et al., 2018; BAKER et al., 1996; MICHAEL et al., 2007) *in vitro* ou *in vivo* de sêmen de humanos, bovinos, javalis, coelhos e garanhões com diversos resultados. Em cães, Michael et al., (2007) testaram as vitaminas E e C, B16, taurina, catalase, N-acetilcisteína na criopreservação do sêmen, sendo que a catalase proporcionou melhor qualidade espermática no pós-descongelamento.

Nos estudos de Hatamoto et al., (2006); Strzezek et al., (2009), eles não encontraram catalase no sêmen canino em nenhuma das três frações: pré-espermática, espermática e pós-espermática. Um estudo sugere que catalase é uma enzima intracelular, e talvez seja por esse motivo que alguns estudos não a detectam no plasma seminal, ou por causa da baixa sensibilidade dos aparelhos utilizados para mensurar essa enzima (LOPES, 2010). No sêmen de algumas espécies (touro, carneiro, javali e coelho), pesquisadores encontraram pouca ou nenhuma quantidade de catalase (HOLLAND; ALVAREZ; STOREY, 1982). Michael et al., (2007) sugerem que o efeito positivo da adição de catalase, em seu estudo, pode ser resultado desse provável déficit. Talvez isso ocorra pelo fato de que o ânion superóxido é um produto primário, que subsequencia a dismutase para H_2O_2 , o qual é o principal alvo desse antioxidante, sob a influência do SOD. No plasma seminal de cães, o SOD está presente nas três frações do ejaculado, sendo o maior antioxidante enzimático em todas as frações, e a glutational peroxidase (GPx) está presente apenas nas frações

espermáticas e pós-espermáticas (STRZEZEK et al., 2009). O estudo de Kawakami et al., (2007) mostrou catalase presente nos ejaculados de cães em menores quantidades que a SOD, e que a adição desses dois antioxidantes no diluidor de sêmen canino melhora a qualidade espermática.

2.5.2 Vitamina E

Do grego tocoferol significa *tocos* = nascimento de crianças e *fero* = promover (LOPES, 2010). Existem oito formas naturais de vitamina E com função antioxidante: quatro tocoferóis e quatro tocotrienóis, que são formados por anel cromático e cadeia lateral. Os tocoferóis e tocotrienóis são denominados, de acordo com a posição do grupo metila no anel cromático, de α , β , γ e δ . Os tocoferóis e os tocotrienóis se diferenciam pela saturação de sua cadeia lateral, sendo que os tocoferóis possuem cadeias totalmente saturadas (BLATT; LEONARD; TRABER, 2001).

O α -tocoferol é o composto antioxidante mais potente da vitamina E (DAD et al., 2006), a qual é considerada o maior antioxidante de membrana lipossolúvel encontrado em células. A peroxidação lipídica é uma reação em cadeia, onde radical gera radical e a vitamina E é um dos únicos capazes de quebrar essa reação em cadeia, pela formação de produtos não radicalares, tornando-se um dos antioxidantes mais eficientes (BAKER et al., 1996; BURTON et al., 1985; SIES, 1993). Ao contrário da catalase, é um antioxidante extracelular e age na membrana plasmática como um antioxidante lipossolúvel (BENDICH, 1990; CHOW, 1991; ESPINOSA-CERVANTES; CÓRDOVA-IZQUIERDO, 2018; MATÉS; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, 2000), que protege a dupla ligação de ácidos graxos insaturados contra a oxidação em cadeia, doando elétrons para os radicais livres (BENDICH, 1990; CHOW, 1991; MATÉS; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, 2000). Não precisa se associar a nenhuma outra substância para interromper a reação em cadeia, por isso é considerada como uma linha única de defesa antioxidante (CHOW, 1991). Reage com velocidade muito alta, suficiente para impedir a reação do radical peroxila com outro ácido graxo insaturado: cerca de 200 vezes mais rápido, comparando com outros antioxidantes sintéticos (BURTON et al., 1985). A vitamina E também tem papel de agente estabilizador da membrana (BRADFORD et al., 2003) e comporta-se como um antioxidante bloqueador (JORDÃO JÚNIOR et al., 1998).

Uma de suas principais vantagens é que o α -tocoferol consegue agir mesmo em concentrações muito pequenas e de ser um agente biológico modificador, agindo de forma sinérgica com a vitamina C, que recicla a vitamina E quando utilizadas em conjunto (LOPES, 2010).

2.6 ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS (*Polyunsaturated Fatty Acids* – PUFAs)

A capacidade de fertilização das células espermáticas dos mamíferos ocorre, principalmente, por possuírem ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) na composição de suas membranas (LECEWICZ et al., 2018a). Tal composição confere às células espermáticas a fluidez necessária para permitir uma maior mobilidade (LECEWICZ et al., 2018a; LONE et al., 2018; WATSON, 1981), isso ocorre devido ao seu ponto de fusão estar relacionado com o número de insaturações, sendo que quanto maior a quantidade de insaturações, mais baixo o ponto de fusão, e portanto, maior fluidez da membrana (SUÁREZ-MAHECHA et al., 2002). Além disto, uma maior quantidade de PUFAs faz com que os espermatozoides apresentem uma maior resistência ao processo de criopreservação. No entanto, esta característica torna o espermatozoide um alvo preferencial da peroxidação lipídica (LECEWICZ et al., 2018a; LONE et al., 2018; WATSON, 1981). O principal PUFA da membrana é o ácido docosahexaenoico (DHA) representando cerca de 67% dos lipídios presentes na membrana acrossomal (AMANN; GRAHAM, 1993).

Os PUFAs presentes na membrana plasmática dos espermatozoides estão associados com a cinética espermática enquanto promovem a fluidez e flexibilidade necessária destas células. Estudos indicam que a presença de DHA na membrana está relacionada com a motilidade espermática de forma positiva. A presença desses ácidos graxos na membrana aumenta a capacidade dos espermatozoides sobreviverem ao processo de criopreservação (LUCIO et al., 2017; NICHI, 2009) e auxiliam na hiperativação espermática e eventos subsequentes da fecundação (ESPINOSA-CERVANTES; CÓRDOVA-IZQUIERDO, 2018; NICHI, 2009; TUFARELLI et al., 2018).

A ação dos radicais livres nos ácidos graxos poli-insaturados é maior que nos saturados, pois são formados por cadeias de átomos de carbono ligados a hidrogênio com um

grupo carboxila terminal (COOH). A presença de insaturações, ou seja, ligações duplas entre carbonos, torna o ácido graxo mais maleável para permitir fluidez a membrana necessária para os eventos associados à fertilização (NICHII, 2009). As EROs têm preferência pelas ligações adjacente à dupla ligação, as de carbono-hidrogênio no grupo metileno (CH₂), iniciando-se uma reação em cadeia de peroxidação lipídica que, se não for interrompida, leva a perda da permeabilidade da membrana, danificando a célula e, conseqüentemente, a função espermática (AITKEN; KRAUSZ, 2001). Todo esse processo faz com que a membrana, perca a permeabilidade iônica seletiva, liberando o conteúdo das organelas e levando a formação de produtos citotóxicos, podendo levar à morte celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Os danos induzidos pelas EROs levam a lipoperoxidação e a rápida perda de ATP que conduzem aos danos do axonema (principal peça motora do flagelo dos espermatozoides) e, portanto, da motilidade espermática, que fica diminuída (ESPINOSA-CERVANTES; CÓRDOVA-IZQUIERDO, 2018).

HIPÓTESE

3 HIPÓTESE

Os espermatozoides caninos são mais susceptíveis a diferentes espécies reativas de oxigênio. Além disso, a associação entre suplemento com DHA no diluidor de sêmen canino e a terapia de antioxidantes específicos nas amostras, previnem crioinjúrias e danos oxidativos aos espermatozoides de cães durante o processo de criopreservação.

OBJETIVOS

4 OBJETIVOS

Os objetivos do presente experimento são:

1) Avaliar a susceptibilidade dos espermatozoides de cães às diferentes espécies reativas de oxigênio (ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila) e ao produto da peroxidação lipídica (malondialdeído) na presença e na ausência de plasma seminal.

2) Avaliar o efeito dos antioxidantes voltados às EROs mais deletérias, na funcionalidade e no status oxidativo dos espermatozoides em amostras de sêmen canino criopreservadas em diluidor contendo PUFA's.

CAPÍTULO 2

5 CAPÍTULO 2: Indução do estresse oxidativo espermático em cães: susceptibilidade contra diferentes espécies reativas de oxigênio e função protetora do plasma seminal

Nívea de Mattos Góes Vieira, João Diego de Agostini Losano, Daniel e Souza Ramos Angrimani, Giulia Kiyomi Vechiato, Kawai, Luana de Cássia Bicudo, Bruno Rogério Rui, Bárbara do Carmo Simões da Silva, Mayra Elena Ortiz D Avila Assumpção, Marcilio Nichi.

Artigo publicado na revista THERIOGENOLOGY, 2018, v. 108, p. 39-45, DOI 10.1016/j.theriogenology.2017.11.020

RESUMO

Estresse oxidativo (EO) é caracterizado pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade antioxidante. Nesse contexto, a composição do plasma seminal (PS) desempenha um papel-chave na proteção do sêmen contra o EO. No entanto, para a criopreservação do sêmen canino, é necessário a remoção do PS. Portanto, uma terapia antioxidante pode ser uma importante alternativa para a criopreservação de sêmen canino. Porém, para que este tratamento seja eficiente a escolha do antioxidante ideal em cada condição é essencial uma vez que cada ERO é preferencialmente neutralizada por diferentes sistemas de antioxidantes. Baseado nessas assertivas, esse estudo teve como objetivo avaliar a susceptibilidade do espermatozoide canino a diferentes desafios oxidativos (ânion superóxido [O_2^-], peróxido de hidrogênio [H_2O_2], radical hidroxil [$OH^\cdot$] e malondialdeído [MDA, produto da peroxidação lipídica]) na presença ou ausência de PS. Foram usados ejaculados de oito cães (N=8) hígidos e sexualmente maduros. Cada ejaculado foi submetido aos desafios oxidativos na presença ou ausência de PS (com ou sem PS) e, após as incubações, as amostras espermáticas foram avaliadas para a susceptibilidade da peroxidação lipídica (TBARS), cinética espermática (CASA), atividade e potencial de membrana mitocondrial (DAB e JC-1, respectivamente), integridade do DNA (SCSA) e integridade das membranas plasmática (PI) e acrossomal (FITC-PSA). Na presença de plasma seminal, os espermatozoides apresentaram sua função mitocondrial preservada. No entanto, na ausência de PS, H_2O_2 reduziu significativamente o potencial de membrana mitocondrial. Além disso, independentemente do PS, H_2O_2 foi deletério para a cinética espermática e para as membranas plasmática e acrossomal. A incubação com $OH^\cdot$ reduziu a atividade mitocondrial e aumentou a

fragmentação do DNA, independentemente da ausência ou presença do PS. No entanto, amostras com PS foram mais resistentes à peroxidação lipídica. Podemos concluir que, H_2O_2 e OH^- demonstraram ser as EROs mais deletérias para o sêmen canino e que o PS protege os espermatozoides canino contra as injúrias mitocondriais e peroxidação lipídica.

Palavras-chave: Sêmen; Cão; Antioxidantes; Malondialdeído; Peroxidação lipídica.

5.1 INTRODUÇÃO

Os cães representam um importante papel na sociedade, com considerável impacto na economia global [1]. Além disso, similaridades genéticas entre cães, canídeos silvestres e humanos, destacam os caninos como modelo experimental ideal para essas espécies [2, 3]. Nesse contexto, novos estudos são direcionados para avanços na tecnologia da reprodução em cães, assim como, inseminação artificial e criopreservação [2]. A criopreservação do sêmen canino permite a preservação a longo prazo de linhagens de raças para fins reprodutivos e a disseminação de material genético mesmo *post mortem* [2].

No entanto, durante o processo de criopreservação o sêmen está propenso a danos de membranas e organelas, prejudicando motilidade bem como a um aumento dos danos no DNA [4,5]. Esses efeitos estão direta e indiretamente relacionados a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelos espermatozoides [4]. Apesar das funções fisiológicas das EROs em eventos como capacitação, hiperativação, reação acrossomal e penetração do espermatozoide no oócito [6], altas quantidades de EROs podem causar danos para a estrutura do espermatozoide como DNA, lipídios, carboidratos e proteínas [6,7]. De fato, os espermatozoides são particularmente susceptíveis aos ataques das EROs devido ao seu citoplasma reduzido e, conseqüentemente, limitado conteúdo de antioxidantes enzimáticos [8]. Além disso, a membrana do espermatozoide é rica em ácido graxo poli-insaturados (PUFA), o que torna a célula mais susceptível ao estresse oxidativo devido às duplas ligações (isto é, insaturações) que são mais facilmente clivadas pelas EROs [9].

Para prevenir os danos oxidativos causados pelas EROs, antioxidantes produzidos fisiologicamente pelo organismo, inibem ou minimizam tais efeitos oxidativos [10]. A

maioria das defesas antioxidantes presentes no sêmen do cão são provenientes do plasma seminal, onde foram previamente identificados a glutathione redutase (GSH), a glutathione peroxidase (GPx), hidróperóxido fosfolipídico glutathione peroxidase (PHGPx) e superóxido dismutase (SOD) [11,12]. No entanto, tais efeitos dos antioxidantes seminais em cães podem não ser efetivos durante a criopreservação, devido a remoção do plasma seminal durante o processamento espermático [13], que contribui para a alta susceptibilidade do espermatozoide canino contra o ataque das EROs [14].

No entanto, a adição de antioxidantes em diluidores durante a criopreservação podem contribuir para proteção do espermatozoide canino contra as injúrias oxidativas [15,16]. Diversos estudos foram realizados com o objetivo de avaliar os efeitos dos antioxidantes na criopreservação dos espermatozoides, no entanto, é possível observar resultados extremamente contraditórios [15,17-20]. Uma das possíveis razões para tais resultados controversos, é o uso do antioxidante inadequado e possivelmente em concentrações inapropriadas. Cada ERO é susceptível a um antioxidante específico [21,22]. Desta forma, nos casos em que a terapia antioxidante utilizada foi inadequada, o tratamento pode levar a resultados ineficazes e até mesmo deletérios. Contudo, escolher o antioxidante ideal através da identificação da ERO mais deletéria pode ser uma alternativa interessante.

Portanto, o objetivo do nosso estudo foi comparar o impacto de diferentes EROs e malondialdeído no espermatozoide canino para identificar o composto mais deletério. Além disso, nosso objetivo foi verificar o possível efeito protetor do plasma seminal contra os desafios oxidativos. Consequentemente, esse resultado poderia permitir direcionar uma terapia antioxidante específica durante a criopreservação seminal em estudos futuros.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Animais

O presente experimento foi aprovado pelo Comitê de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo (protocolo número

7693020215). Caso indicação contrária, todos os reagentes foram comprados da Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Foram utilizados 8 cães (N = 8; entre 2-6 anos de idade), sendo um da raça pastor alemão, seis da raça pastor belga malinois e um da raça labrador; peso médio entre 28,2-30,5 kg. Os animais eram saudáveis, a dieta fornecida era ração da Royal Canin Max Adult® duas vezes ao dia, eram sexualmente maduros e pertenciam ao Centro de Reprodução e Distribuição de Caninos do 2º Batalhão de Polícia do Exército (Osasco, São Paulo – Brasil). Além disso, o sêmen desses animais eram coletados periodicamente para serem usados na rotina de reprodução assistida do Centro de Reprodução e Distribuição de Cães do Exército.

5.2.2 Delineamento experimental

Oito ejaculados (N = 8) foram submetidos ao arranjo fatorial 2X5, no qual consideramos o efeito do plasma seminal (presença ou ausência) e os sistemas de incubação com diferentes EROs (ânion superóxido [O_2^-], peróxido de hidrogênio [H_2O_2], radical hidroxil [OH^-]), o subproduto da peroxidação lipídica (malondialdeído [MDA]) e o controle com meio TALP modificado (NaCl 0,1M; KCl 0,003M, $MgCl_2$ 0,0004M, NaH_2PO_4 0,0003M, $NaHCO_3$ 0,025M; $CaCl_2 \cdot H_2O$ 0,003M; ácido láctico syruposo 0,3%v/v; Hepes 0,01M; pH 7,4) como fatores experimentais.

5.2.3 Coleta e processamento do sêmen

Todos os animais foram submetidos a coleta de sêmen usando o método de manipulação digital. Foram feitas análises macroscópicas e microscópicas; todas amostras contaminadas foram excluídas (isto é, urina e sangue) ou motilidade espermática abaixo de 70%. O sêmen foi diluído (1:200) em solução salina de formol para contagem de espermatozoides na câmara de Neubauer, e a concentração foi expressa em milhões de espermatozoides por mL.

Cada ejaculado foi dividido em 2 frações, com plasma seminal (PS) ou sem plasma seminal (SPS), depois foram centrifugadas a 600xg durante 10 minutos. Para isso, o sobrenadante das frações SPS foram descartados e o *pellet* suspenso em meio TALP aquecido a 37°C. No *pellet* da fração PS, seu sobrenadante voltou a ser suspenso nele mesmo. As duas frações (PS e SPS) foram suspensas na mesma concentração (100×10^6 espermatozoides/mL).

Então, as frações (com e sem plasma seminal) foram subdivididas em cinco alíquotas e incubadas por 30 minutos a 37°C com sistemas de geração de EROs (ânion superóxido [O_2^-], peróxido de hidrogênio [H_2O_2], radical hidroxil [$OH^\cdot$]), um produto da peroxidação lipídica (MDA) e finalmente, o sistema de controle.

5.2.4 Desafio oxidativos *in vitro*

Alíquotas de sêmen (400 μ L) foram incubadas com diferentes sistemas de produção de EROs e malondialdeído, de acordo com as metodologias descritas por Rui et al. [23] e Kawai et al. [24]. Para todas as incubações foram usadas as concentrações de 20×10^6 espermatozoides por amostra. No grupo Controle, 200 μ L de meio TALP foi adicionado a 400 μ L de amostra diluída. O sistema xantina-xantina-oxidase (Xantina 0,5mM; Xantina Oxidase 0,05 UI/mL) foi usado para a induzir a produção do ânion superóxido (O_2^-). A produção de radical hidroxila ($OH^\cdot$) foi induzida através da incubação com sulfato ferroso (Fe_2SO_4 , 4mM) e ascorbato de sódio (20mM). Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o malondialdeído (MDA) foram adicionados diretamente nas alíquotas na concentração de 4mM. As amostras foram incubadas durante o período de 30 minutos a 37°C em banho-maria, e imediatamente após a incubação, os espermatozoides foram submetidos às análises.

5.2.5 Análise espermática

5.2.5.1 Análises computadorizadas dos padrões de cinética espermática

Os padrões cinéticos foram avaliados usando Análise Espermática Computadorizada (CASA; Hamilton-Thorne®, Ivos 12.3, USA). Para as análises, 10µL foi usado na câmara de contagem e dez campos foram selecionados para serem analisados. As seguintes variáveis foram consideradas: motilidade (%), motilidade progressiva (%), VAP (velocidade média de percurso, µm/s), VSL (velocidade retilínea, µm/s), VCL (velocidade curvilínea, µm/s), ALH (amplitude do movimento lateral da cabeça, µm), BCF (frequência de batimento cruzado, Hz), STR (retilinearidade, %) e LIN (linearidade, %). Além desses parâmetros, a velocidade do espermatozoide foi também dividida em quatro grupos: rápido (%), médio (%), lento (%) e estático (%) [25].

5.2.5.2 Testes funcionais espermáticos

Os testes funcionais espermáticos foram realizados de acordo com a metodologia desenvolvida por Lucio et al. [15], para cães. Usando a citometria de fluxo (Guava EasyCyteTM Mini System, Guava® Technologies, 190 Hayward, CA, USA) e a citometria 3'3 diaminobenzidina (técnica DAB).

O equipamento de citometria de fluxo contém um laser azul, que opera a 488nm e emite uma radiação a laser visível de 20mW. Um total de 10.000 eventos por amostra foram analisados e os dados correspondentes para amarelo (fotodetector PM1 – 583nm), vermelho (fotodetector PM2 – 680nm) e os sinais verdes fluorescentes (fotodetector PM3 - 525nm) foram relatados após a amplificação logarítmica. Todos os dados foram analisados pelo software FlowJo® v10.2.

Membranas plasmática e acrossomal foram avaliadas pelas sondas de *iodeto propidium* (PI) e FITC conjugado com *Pisum sativum agglutinin* (FITC-PSA), respectivamente. Essa associação de fluoróforos divide a população espermática em quatro

grupos: membrana intacta e acrossomo intacto (MIAI), membrana intacta e acrossomo lesionado (MIAL), membrana lesionada e acrossomo intacto (MLAI) e membrana lesionada e acrossomo lesionado (MLAL). O procedimento foi realizado com 185.000 células diluídas em TALP e corado com 0,5mg/mL PI em NaCl 0,9% e 100mg/mL FITC-PSA (FITC-PSA L-0770) em solução de azida sódica a 10% em DPBS. As amostras foram analisadas pelo citômetro de fluxo após 10 minutos, agitada a 488nm e detectada a 630-650nm (PI) a 515-530nm (FITC).

Potencial de membrana mitocondrial (PMM) foi analisado pela sonda JC-1 (5,5',6,6'- tetracoloro-1,1',3,3'201-cloreto de tetraetil-benzimidazolilcarbocianina; Invitrogen, Eugene, OR, USA). Para realizar essa técnica, 187.500 espermatozoides diluídos em 12,5µL meio TALP, foram adicionados a 0,5µL de sonda fluorescente JC-1 (76,5mM) e incubado a 37°C por 5 minutos. As amostras foram classificadas em porcentagens de células com alto (JC-1 alto), intermediário (JC-1 intermediário) e baixo potencial de membrana mitocondrial (JC-1 baixo).

O teste de estabilidade da cromatina foi feito baseado no ensaio da estrutura da cromatina dos espermatozoides (SCSA) descrito por Evenson e Jost [26] e modificado por Lucio et al. [4], para cães. Para realizar essa técnica, 375.000 células foram incubadas com tampão TNE (Tris-HCl 0,01M, NaCl 0,15M, EDTA 1mM e água destilada, pH 7,4) e detergente ácido (HCl 0,08M, NaCl 0,15M, Triton X-100 0,1% em água destilada, pH 1,2). Após 30 segundos, a sonda laranja de acridina (solução estoque de 6µg/mL) foi adicionada, e cada amostra foi analisada após 5 minutos de incubação a 37°C, sob excitação a 488nm e detecção a 630-650nm (vermelho) e 515-530nm (verde).

A atividade mitocondrial foi avaliada através da técnica citoquímica 3'3 diaminobenzidina (ensaio DAB) de acordo com a metodologia usada por Losano et al. [27]. Nessa técnica, a 3'3 diaminobenzidina é oxidada pela enzima citocromo C, formando um complexo marrom que é depositado na mitocôndria ativa [28]. Para a realização desta técnica, 20µL de sêmen foi incubado com 20µL de 3,3 diaminobenzidina em microtubos âmbar por 1 hora em banho-maria a 37°C. Após a incubação, foram feitos esfregaços em lâmina de vidro, no escuro. As placas foram então fixadas em formaldeído a 10% por 10 minutos e secas no ar sob proteção de luz. As análises foram feitas em microscopia de contraste de fase na magnificação de 1000x em óleo de imersão. Com células foram contadas e classificados dentro de 4 classes de acordo com a porcentagem de peça intermediária corada:

completamente corada, indicando alta atividade mitocondrial (DAB I); mais de 50% da peça intermediária corada, indicando atividade média (DAB II); menos de 50% da peça intermediária não corada, indicando baixa atividade (DAB III); e peça intermediária não corada completamente, indicando ausência de atividade mitocondrial (DAB IV). Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

5.2.5.3 Avaliação da resistência espermática ao estresse oxidativo

Para avaliar a susceptibilidade à peroxidação lipídica, nós realizamos o ensaio TBARS (Substância Reativa ao Ácido Tiobarbitúrico), de acordo com a metodologia adaptada por Nichi et al. [9]. Essa técnica foi realizada após as incubações de EROs durante 30 minutos. Então, após essas induções, ácido tricloroacético a 10% (600µL) foi adicionado. As amostras foram centrifugadas a 20.800xg por 15 minutos a 5°C por precipitação de proteínas e debris. Posteriormente, 800µL do sobrenadante foi removido e transferido para criotubos. Ácido tiobarbitúrico a 1% (TBA; 800µL) foi adicionado aos tubos, cada um foi então incubado a 95°C em banho-maria por 15 minutos. Nessa reação, malondialdeído (MDA; produto primário da peroxidação lipídica) e reação de TBA, produz um complexo de coloração rosa. Essa coloração foi quantificada no espectrofotômetro (Ultrospec 3300 Pro® Amersham Biosciences, USA) no comprimento de onda de 532nm. Os resultados foram expressos em nanogramas de TBARS/10⁶ espermatozoide.

5.2.6 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados pelo Sistema SAS para Windows (SAS, *Institute Inc.*, Cary, NC, USA), e foram testados quanto à normalidade dos resíduos (distribuição normal) e homogeneidade das variâncias através do aplicativo *Guided Data Analysis*. Os dados que não tiveram essas premissas foram transformados. Se a normalidade não foi obtida, o procedimento NPAR1WAY para análises não-paramétricas das variáveis foram consideradas. Foi considerado um arranjo fatorial 2X5, isso significa que foram

avaliadas as interações entre plasma seminal (com ou sem plasma semina) e incubações (Controle, O_2^- , H_2O_2 , OH^- , e MDA) pelo GLM. Nos casos em que as interações foram significativas, comparações foram feitas considerando os dois fatores (PS e incubações). Quando não havia interações significantes, os fatores foram avaliados separadamente (efeito do PS, independente das incubações e efeito das incubações independente da presença ou ausência de PS). Para a descrição dos resultados, médias e seus respectivos erros padrões foram expressos. O nível de significância usado para rejeitar H_0 (hipótese nula) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05 consideramos diferença estatística entre os diferentes grupos.

5.3 RESULTADOS

Nós observamos interações significativas entre plasma seminal (PS) e os diferentes desafios oxidativos para as variáveis de potencial de membrana mitocondrial (PMM) e susceptibilidade à peroxidação lipídica, teste de TBARS (Tabela 1). Desta forma, para essas variáveis, avaliamos o efeito de diferentes espécies reativas de oxigênio na presença ou ausência de plasma seminal. Para os outros atributos espermáticos não observamos nenhuma interação significativa; nesse caso, avaliamos os efeitos do plasma seminal e as induções oxidativas a EROs separadamente.

Tabela 1 - Efeito de probabilidade de incubação com diferentes espécies reativas de oxigênio e produto da peroxidação lipídica (O_2^- : ânion superóxido, H_2O_2 : peróxido de hidrogênio, $OH^\cdot$: radical hidroxil, e MDA: malondialdeído) e interação do plasma seminal (incubação x plasma seminal) nos atributos espermáticos, padrões cinéticos e status oxidativo – São Paulo – 2018.

Variáveis	Incubação	Plasma Seminal	Incubação x Plasma Seminal
VAP ($\mu\text{m/s}$)	<,0001	0,0004	0,8286
VSL ($\mu\text{m/s}$)	<,0001	<,0001	0,7603
VCL ($\mu\text{m/s}$)	<,0001	0,0234	0,6419
ALH (μm)	0,0042	0,5848	0,1965
BCF (Hz)	0,0004	0,0911	0,6312
STR (%)	<,0001	0,1132	0,6892
LIN (%)	<,0001	0,0505	0,8042
Motilidade total (%)	<,0001	0,0001	0,4824
Motilidade progressiva (%)	0,003	<,0001	0,1819
Rápido (%)	0,0177	<,0001	0,1802
Médio (%)	0,0721	0,4718	0,3879
Lento (%)	0,8081	0,6206	0,3169
Estático (%)	<.0001	0,0002	0,5652
PMM alta (%)	<.0001	<.0001	0,0006
PMM baixa (%)	0,2685	<.0001	0,0984
PMM intermediária (%)	0,0365	<.0001	0,0061
DABI (%)	<.0001	0,8152	0,7773
DABII (%)	0,8629	0,0465	0,4789
DABIII (%)	0,427	0,6142	0,3749
DABIV (%)	<.0001	0,0576	0,2772
MLAL (%)	0,0529	0,1263	0,7962
MIAL (%)	0,3415	0,0165	0,3188
MLAI (%)	0,0288	0,2591	0,7990
MIAI (%)	0,0249	0,2814	0,5846
SCSA (%)	0,2191	0,9142	0,9522
TBARS ($\text{ng}/10^6 \text{ sptz}$)	<.0001	<.0001	0,0025

Na presença de plasma seminal, não observamos diferenças significativas entre os diferentes desafios oxidativos no potencial de membrana mitocondrial (Figura 4). Por outro lado, na ausência de PS, o peróxido de hidrogênio foi extremamente deletério para o potencial de membrana mitocondrial seguido do ânion superóxido (Figura 4A, 4B e 4C). Com relação à peroxidação lipídica, o grupo de MDA na ausência de plasma seminal apresentou aumento no índice de peroxidação lipídica comparado ao grupo PS (Figura 4D).

Figura 4. Efeito das incubações (INC) com desafios oxidativos (Cont.: controle, O_2^- : ânion superóxido, H_2O_2 : peróxido de hidrogênio, $OH^\cdot$: radical hidroxil, e MDA: malondialdeído) e plasma seminal (PS; plasma seminal e sem plasma seminal) em alto (A- PS: $p < 0,0001$; INC: $p < 0,0001$; PS*INC: $p = 0,0006$), intermediário (B- PS: $p < 0,0001$; INC: $p = 0,0365$; PS*INC: $p = 0,0061$) e baixo (C- PS: $p < 0,0001$; INC: $p < 0,2$; PS*INC: $p = 0,009$) potencial de membrana plasmática (PMM) e susceptibilidade espermática a peroxidação lipídica (D- PS: $p < 0,0001$; INC: $p < 0,0001$; PS*INC: $p = 0,0025$; teste de TBARS) – São Paulo – 2018. ^{w,x}: letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos com plasma seminal ($p < 0,05$). A, B, C: letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos sem plasma seminal ($p < 0,05$) * indica diferenças estatísticas no mesmo tratamento com ou sem plasma seminal ($p < 0,05$).

A indução com peróxido de hidrogênio reduziu significativamente as motilidades totais e progressivas (Figura 5A e 5B, respectivamente). Também, essas EROs levaram a um prejuízo significativo na cinética padrão do espermatozoide e o radical hidroxila foi a ERO mais prejudicial para a atividade mitocondrial comparado às outras substâncias oxidativas (Figura 6). Além do mais, o radical hidroxil foi as ERO mais deletéria para as membranas plasmática e acrossomal (Figura 5D).

Figura 5. Efeito dos desafios oxidativos (Cont.: controle, O_2^- : ânions superóxido, H_2O_2 : peróxido de hidrogênio, OH^- : radical hidroxil, e MDA: malondialdeído) na motilidade total (A) e progressiva (B), fragmentação de DNA (SCSA, C) e prejuízos nas membranas acrossomal e plasmática (MLAL, D) – São Paulo – 2018. ^{a,b,c}: letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre tratamentos com plasma seminal ($p < 0,05$).

O grupo com plasma seminal apresentou alta motilidade total e progressiva, alta porcentagem de espermatozoides rápidos e aumento dos padrões cinéticos. Para as outras variáveis, não observamos diferenças significativas entre os grupos com ou sem plasma seminal.

Figura 6. Efeito dos desafios oxidativos (Cont.: controle, O₂⁻: ânion superóxido, H₂O₂: peróxido de hidrogênio, OH⁻: radical hidroxil, e MDA: malondialdeído) na atividade mitocondrial alta (A), média (B), baixa (C) e ausente (D) – São Paulo – 2018. ^{a,b,c}: diferentes letras indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos com plasma seminal ($p < 0,05$).

5.4 DISCUSSÃO

Estudos avaliando os efeitos da eficácia dos antioxidantes para combater os efeitos indesejáveis durante a criopreservação espermática usualmente levam a resultados contraditórios. Algumas investigações relataram o efeito protetor contra as lesões oxidativas por congelamento [29,30]. No entanto, outros estudos não foram capazes de demonstrar efeitos significativos; alguns levando até mesmo ao prejuízo da função espermática [31,32]. Nesse contexto, alguns pontos devem ser levados em consideração quando realizados os tratamento antioxidantes. Uma questão importante é que cada ERO é inativada por um sistema antioxidante específico [33]; desta forma, se a terapia antioxidante é escolhida aleatoriamente, esse tratamento pode não ser eficiente nos casos em que não foi identificada a ERO que é a principal responsável pelos danos oxidativos [15]. Além disso, as EROs

desempenham um papel fundamental nos processos fisiológicos espermáticos (e.g., capacitação [6], hiperativação [7], reação acrossomal [34] e ligação ao oócito [6]), neste caso, se a concentração do antioxidante for excessiva, esses importantes mecanismos podem ser inibidos, resultando no comprometimento da função espermática [34,35]. Consequentemente, conhecendo-se os efeitos de cada ERO nos atributos espermáticos, isso poderia proporcionar importantes prenúncios da terapia ideal direcionada especificamente para o sêmen do cão. Além disso, avaliar a importância do plasma seminal no estado oxidativo do sêmen do cão é especialmente interessante nessa espécie, pois a remoção desta substância é um passo fundamental nas biotécnicas, como a criopreservação.

Em um estudo anterior conduzido por nosso grupo, observamos que a susceptibilidade do sêmen equino a uma específica ERO é também dependente da presença do plasma seminal. Neste estudo, espermatozoide equino na presença de PS é extremamente susceptível ao radical hidroxil. No entanto, na ausência de plasma seminal, o malondialdeído (isto é, o produto tóxico da peroxidação lipídica), é mais prejudicial que todas as EROs estudadas [24]. Por outro lado, observamos que peróxido de hidrogênio é a ERO mais deletéria para o espermatozoide de galo, com outro impacto significativo nas taxas de fertilidade [36]. Nesse contexto, avaliamos a susceptibilidade do espermatozoide canino para diferentes desafios oxidativos.

A respeito dos diferentes desafios oxidativos, na presença de plasma seminal, não observamos mudanças no potencial de membrana mitocondrial (PMM). No entanto, após a remoção de SP, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) reduziu dramaticamente a função mitocondrial. De fato, nos cães o plasma seminal contém glutathione peroxidase e catalase, principais responsáveis pela erradicação dessas EROs [11,37]. Além disso, peróxido de hidrogênio é prejudicial à função mitocondrial devido a sua alta capacidade de penetrar na membrana celular [38]. Nossos dados demonstraram que o ânion superóxido (O_2^-) também é mais deletério para a PMM na ausência de plasma seminal. A geração de EROs ocorre na reação de cascata redox na qual o ânion superóxido sofre um processo de dismutação pela enzima superóxido dismutase (SOD), e consequentemente é convertida em peróxido de hidrogênio [39]. Portanto, apesar do ânion superóxido ter baixa reatividade e pouca capacidade de penetrar nas membranas, sempre que convertida a peróxido de hidrogênio, pode prejudicar muito as estruturas celulares [40,41]. Assim sendo, acreditamos que o ânion superóxido altera significativamente a função mitocondrial devido a essa reação redox.

Além da abrupta diminuição do potencial de membrana mitocondrial causada pelo H_2O_2 , o radical hidroxil ($\text{OH}^\cdot$) foi a ERO mais deletéria para a atividade mitocondrial (AM). Curiosamente, embora o $\text{OH}^\cdot$ tenha reduzido a AM, não foi prejudicial como o H_2O_2 para a motilidade. Apesar da estreita relação entre PMM e AM e que, ambos poderiam ser bons indicadores de função mitocondrial, eles devem ser considerados separadamente. PMM está relacionada com a diferença entre concentração de prótons (H^+) nos espaços entre as membranas e a matriz mitocondrial, enquanto a AM está relacionada ao transporte de elétrons ao longo da cadeia respiratória [42]. O alto PMM está diretamente relacionado ao produto de ATP e consequentemente à motilidade espermática. A atividade mitocondrial, por sua vez, pode não ter uma relação direta com a cinética espermática. Isso pode ser explicado pelo fato de que quando o potencial de membrana mitocondrial está constantemente alto, a tendência é que o transporte de elétrons pela cadeia respiratória decline em resposta [43,44]. Assim sendo, H_2O_2 , provavelmente pela redução significativa do potencial de membrana mitocondrial foi também a ERO que mais afetou a motilidade e outro padrão de cinética espermática.

O grupo induzido com $\text{OH}^\cdot$ teve maior porcentagem de membrana plasmática lesionada e acrossomo lesionado (MLAL) e danos no DNA (SCSA). Estudos mostraram que essa ERO teve alta capacidade de reagir com as biomoléculas causando danos celulares, mesmo tendo uma meia-vida mais curta em comparação com outras EROs [38,45]. Radical hidroxil é a ERO que teve maior capacidade de peroxidação lipídica das membranas biológicas e, pode causar danos a essas estruturas e conduzir a geração de produtos da peroxidação lipídica, as quais podem ser mais deletérias que as EROs [24,46]. Neste contexto, o malondialdeído (MDA), o principal subproduto da peroxidação lipídica, substância com meia-vida longa e alta capacidade de causar danos as estruturas celulares pode ser um fator crucial [47-49]. Para o espermatozoide equino essas moléculas podem ser ainda mais deletérias que as próprias EROs [24]. Verificou-se nesse estudo que, na ausência de plasma seminal, o MDA foi mais deletério para o sêmen do que as espécies reativas de oxigênio e, provavelmente algumas substância presente no plasma seminal inativa essa substância. Nesse trabalho ainda, a ausência de plasma seminal, as concentrações de TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico) atingiu duas vezes os valores da concentração de TBARS no grupo sem plasma seminal. De fato, trabalhos demonstraram que a carnosina, o dipeptídeo presente no plasma seminal, tem essa função [50-52]. Além disso, para os grupos PS e SPS, espera-se resultados de maiores concentrações de TBARS no grupo MDA, já que esta molécula é a principal substância reativa do ácido tiobarbitúrico e pode influenciar a análise

pelo espectrofotômetro [9].

Como conclusão, nossos dados demonstram que o plasma seminal tem um efeito protetor contra a peroxidação lipídica e às lesões mitocondriais em circunstâncias de indução do estresse oxidativo. Nosso estudo pode contribuir para direcionar terapias antioxidantes específicas em biotecnologias de sêmen, como a criopreservação, uma vez que esse procedimento é conhecido por causar um desequilíbrio oxidativo. Assim sendo, como o H_2O_2 foi a mais nociva das EROs, nós sugerimos a terapia antioxidante usando o sistema com glutathione peroxidase/reductase ou catalase, para que a concentração de antioxidantes não ultrapasse os níveis fisiológicos. Finalmente, a associação com antioxidantes não-enzimáticos como o α -tocoferol e ácido ascórbico pode ser uma alternativa interessante, uma vez que o radical hidroxil também foi prejudicial para o espermatozoide canino.

REFERÊNCIAS

- [1] Jang G, Kim MK, Lee BC. Current status and applications of somatic cell nuclear transfer in dogs. *Theriogenology* 2010;74:1311-20.
- [2] Thomassen R, Farstad W. Artificial insemination in canids: a useful tool in breeding and conservation. *Theriogenology* 2009;71:190-9.
- [3] Kirchhoff C. The dog as a model to study human epididymal function at a molecular level. *Mol Hum Reprod* 2002;8:695-701.
- [4] Lucio CF, Regazzi FM, Silva LC, Angrimani DS, Nichi M, Vannucchi CI. Oxidative stress at different stages of two-step semen cryopreservation procedures in dogs. *Theriogenology* 2016;85:1568-75.
- [5] Wakamatsu TH, Dogru M, Matsumoto Y, Kojima T, Kaido M, Ibrahim OM, et al. Evaluation of lipid oxidative stress status in Sjogren syndrome patients. *Investigative Ophthalmol Vis Sci* 2013;54:201-10.
- [6] de Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev reproduction* 1997;2:48-54.
- [7] Griveau JF, Le Lannou D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl* 1997;20:61-9.
- [8] Aitken RJ, Sawyer D. The human spermatozoon not waving but drowning. *Adv Exp Med Biol* 2003;518:85e98.
- [9] Nichi M, Goovaerts IG, Cortada CN, Barnabe VH, De Clercq JB, Bols PE. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 degrees C. *Theriogenology* 2007;67:334-40.
- [10] Shi Y, Pulliam DA, Liu Y, Hamilton RT, Jernigan AL, Bhattacharya A, et al. Reduced mitochondrial ROS, enhanced antioxidant defense, and distinct age-related changes in oxidative damage in muscles of long-lived *Peromyscus leucopus*. *Am J physiology Regul Integr Comp physiology* 2013;304:R343-55.
- [11] Angrimani DSR, Lucio CF, Veiga GA, Silva LC, Regazzi FM, Nichi M, et al. Sperm maturation in dogs: sperm profile and enzymatic antioxidant status in ejaculated and epididymal spermatozoa. *Andrologia* 2014;46:814-9.
- [12] Strzezek R, Koziorowska-Gilun M, Kowalowka M, Strzezek J. Characteristics of antioxidant system in dog semen. *Pol J veterinary Sci* 2009;12:55-60.
- [13] Alcantar-Rodriguez A, Medrano A. The effect of cooling to different subzero temperatures on dog sperm cryosurvival. *Reproduction Domestic Animals Zuchthygiene* 2017;52(3):422-8.
- [14] Farstad W. Cryopreservation of canine semen - new challenges. *Reproduction Domestic animals* 2009;44(Suppl 2):336-41.

- [15] Lucio CF, Silva LC, Regazzi FM, Angrimani DS, Nichi M, Assumpcao MEOA, et al. Effect of reduced glutathione (GSH) in canine sperm cryopreservation: in vitro and in vivo evaluation. *Cryobiology* 2016;72:135-40.
- [16] Beccaglia M, Anastasi P, Chigioni S, Luvoni GC. TRIS-lecithin extender supplemented with antioxidant catalase for chilling of canine semen. *Reproduction Domestic animals* 2009;44(Suppl 2):345-9.
- [17] Strzezek R, Koziorowska-Gilun M, Stawiszynska M. Cryopreservation of canine semen: the effect of two extender variants on the quality and antioxidant properties of spermatozoa. *Pol J Vet Sci* 2012;15:721-6.
- [18] Neagu VR, Garcia BM, Sandoval CS, Rodriguez AM, Ferrusola CO, Fernandez LG, et al. Freezing dog semen in presence of the antioxidant butylated hydroxytoluene improves postthaw sperm membrane integrity. *Theriogenology* 2010;73:645-50.
- [19] Monteiro JC, Goncalves JS, Rodrigues JA, Lucio CF, Silva LC, Assumpcao MEOA, et al. Influence of ascorbic acid and glutathione antioxidants on frozenthawed canine semen. *Reproduction Domestic animals* 2009;44(Suppl 2): 359-62.
- [20] Michael A, Alexopoulos C, Pontiki E, Hadjipavlou-Litina D, Saratsis P, Boscos C. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology* 2007;68: 204-12.
- [21] Opuwari CS, Henkel RR. An update on oxidative damage to spermatozoa and oocytes. *BioMed Res Int* 2016;2016:9540142.
- [22] Agarwal A, Durairajanayagam D, du Plessis SS. Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. *Reprod Biol Endocrinol* 2014;12:112.
- [23] Rui BR, Shibuya FY, Kawaoku AJ, Losano JD, Angrimani DS, Dalmazzo A, et al. Impact of induced levels of specific free radicals and malondialdehyde on chicken semen quality and fertility. *Theriogenology* 2017;90:11-9.
- [24] Kawai GKV, Gurgel JRC, Losano JDdA, Dalmazzo A, Rocha CC, Tsunoda RH, et al. Susceptibility of stallion spermatozoa to different oxidative challenges: role of seminal plasma. *J Equine Veterinary Sci* 2017;55:76-83.
- [25] Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 2002;57:149-79.
- [26] Evenson D, Jost L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Methods Cell Sci* 2000;22:169e89.
- [27] Losano JDA, Angrimani DSR, Pereira RJG, Rocha AM, Criscuolo TS, Barnabe VH, et al. Utilisation of sperm-binding assay combined with computer-assisted sperm analysis to evaluate frozen-thawed bull semen. *Andrologia* 2015;47: 77-84.
- [28] Hrudka F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. *Int J Androl* 1987;10:809-28.

- [29] Greco E, Iacobelli M, Rienzi L, Ubaldi F, Ferrero S, Tesarik J. Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidant treatment. *J Androl* 2005;26:349-53
- [30] Greco E, Romano S, Iacobelli M, Ferrero S, Baroni E, Minasi MG, et al. ICSI in cases of sperm DNA damage: beneficial effect of oral antioxidant treatment. *Hum Reprod* 2005;20:2590-4.
- [31] Losano JDA, Angrimani DSR, Redondo RF, Brito MM, Rui BR, Kawai GKV, et al. Deleterious effect of high carnosine concentrations in extenders during sperm cryopreservation in dogs. *J Veterinary Androl* 2017;2.
- [32] Donnelly ET, McClure N, Lewis SEM. Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. *Fertil Steril* 1999;72:484-95.
- [33] Nordberg J, Arnér ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system1 1This review is based on the licentiate thesis “Thioredoxin reductase interactions with the redox active compounds 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and lipoic acid” by Jonas Nordberg, 2001, 31. Stockholm: Karolinska Institute; 2001. p. 1287-312. ISBN 91-631-1064-4. *Free Radical Biology and Medicine*.
- [34] de Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev Reproduction* 1997;2:48-54.
- [35] Aitken RJ, Fisher HM, Fulton N, Gomez E, Knox W, Lewis B, et al. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine. *Mol reproduction Dev* 1997;47:468-82.
- [36] Rui BR, Shibuya FY, Kawaoku AJT, Losano JDA, Angrimani DSR, Dalmazzo A, et al. Impact of induced levels of specific free radicals and malondialdehyde on chicken semen quality and fertility. *Theriogenology* 2017;90:11-9.
- [37] Kawakami E, Takemura A, Sakuma M, Takano M, Hirano T, Hori T, et al. Superoxide dismutase and catalase activities in the seminal plasma of normozoospermic and asthenozoospermic Beagles. *J veterinary Med Sci* 2007;69:133-6.
- [38] Nordberg J, Arnér ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system1. *Free Radic Biol Med* 2001;31:1287-312.
- [39] Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J physiology* 2003;552:335-44.
- [40] Oehninger S, Blackmore P, Mahony M, Hodgen G. Effects of hydrogen peroxide on human spermatozoa. *J Assisted Reproduction Genet* 1995;12: 41-7.
- [41] Aitken RJ. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction, Fertil Dev* 1995;7:659-68.
- [42] Losano JDA, Angrimani DRS, Dalmazzo A, Rui BR, Brito MM, Mendes CM, et al. Effect of mitochondrial uncoupling and glycolysis inhibition on ram sperm functionality. *Reproduction Domestic Animals* 2017;52:289-97.

- [43] Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett* 2001;495:12-5.
- [44] Terada H. Uncouplers of oxidative phosphorylation. *Environ Health Perspect* 1990;87:213.
- [45] Sakkas D, Alvarez JG. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. *Fertil Steril* 2010;93:1027-36.
- [46] Baumber J, Ball BA, Linfor JJ, Meyers SA. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *J Androl* 2003;24:621-8.
- [47] Nichi M, Bols PEJ, Zuge RM, Barnabe VH, Goovaerts IGF, Barnabe RC, et al. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. *Theriogenology* 2006;66:822-8.
- [48] John Aitken R, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol reproduction* 1989;41:183-97.
- [49] Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies-Morel MC. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrossomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *J Androl* 2000;21:895-902.
- [50] Ducci M, Pacchini S, Niccolini A, Gazzano A, Cerri D, Gadea J, et al. Concentrations of carnosine, anserine, L-histidine and 3-methyl histidine in boar spermatozoa and sheep milk by a modified HPLC method. *Pol J veterinary Sci* 2005;9:159-63.
- [51] Ducci M, Pacchini S, Niccolini A, Viale A, Gazzano A, Martelli F. Poster abstracts- quantitative determination of imidazole dipeptides in stallion spermatozoa and seminal plasma. *Reprod Domest Anim* 2005;40:379.
- [52] Hipkiss AR, Preston JE, Himsworth DTM, Worthington VC, Abbot NJ. Protective effects of carnosine against malondialdehyde-induced toxicity towards cultured rat brain endothelial cells. *Neurosci Lett* 1997;238:135-8.

CAPÍTULO 3

6 CAPÍTULO 3: Efeito dos antioxidantes não enzimático (vitamina E) e enzimático (catalase) em amostras de sêmen canino criopreservadas em diluidor contendo DHA

Nívea de Mattos Góes Vieira, João Diego de Agostini Losano, Giulia Kiyomi Vechiato Kawai, Camilla Mota Mendes, Maíra Morales Brito, Bruno Rogério Rui, Marcilio Nichi.

Artigo a ser submetido para a revista THERIOGENOLOGY.

RESUMO

Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs), como o ácido docosahexaenoico (DHA), é uma alternativa para melhorar a qualidade espermática canina de amostras criopreservadas, aumentando sua fluidez de membrana. Por outro lado, os PUFAs podem aumentar a susceptibilidade dos espermatozoides à peroxidação lipídica. Para melhorar esse cenário, uma alternativa seria testar um diluidor contendo DHA e adicionar os antioxidantes nas amostras, prevenindo, desta forma, o efeito deletério destes ácidos graxos frente a um evento oxidativo, como a criopreservação. Desse modo, nosso estudo teve como objetivo avaliar a suplementação dos antioxidantes vitamina E e catalase em amostras de sêmen criopreservadas em diluidor contendo DHA. Para esse propósito, dividimos nosso trabalho em duas etapas, nas quais foram utilizados ejaculados de oito cães (N=8). No primeiro experimento, cada ejaculado foi dividido em quatro alíquotas, sendo a primeira o grupo controle (não tratada) e as remanescentes foram tratadas com concentrações crescentes de DHA ao diluidor (1 μ M, 5 μ M e 10 μ M) e, subsequentemente, criopreservadas. No segundo experimento, cada ejaculado também foi dividido em quatro alíquotas, sendo uma delas o grupo controle, e as demais tratadas com os seguintes antioxidantes: vitamina E (0,6mM), catalase (300U/mL), e a combinação de ambos, sendo que, todos os grupos receberam o diluidor contendo a concentração de DHA selecionada no primeiro experimento (DHA 5 μ M). As amostras foram avaliadas quanto à susceptibilidade da peroxidação lipídica (TBARS), cinética espermática (CASA), atividade e potencial de membrana mitocondrial (DAB e JC-1, respectivamente), integridade do DNA (SCSA) e integridade das membranas plasmática (PI) e acrossomal (FITC-PSA). Em relação a cinética espermática, foi possível observar que o grupo tratado com 5 μ M e 10 μ M DHA apresentaram maiores porcentagens de células nas variáveis de espermatozoides com motilidade progressiva e velocidade rápida, com resposta semelhante ao grupo controle; e que o grupo de 1 μ M DHA demonstrou menores porcentagens de espermatozoides, apresentando diferença significativa comparando ao controle em relação a

essas mesmas variáveis. Finalmente, observamos menor porcentagem de espermatozoides estáticos no grupo 5 μ M DHA em comparação a todos os outros grupos. Desta forma, selecionamos a concentração de 5 μ M DHA para associar com os antioxidantes vitamina E (0,6mM) e catalase (300U/mL) no segundo experimento, cujos resultados mostraram que o grupo contendo 5 μ M DHA no diluidor de sêmen canino tratado com vitamina E promoveu efeitos benéficos nas características de cinética espermática, como velocidade média de percurso, velocidade linear, motilidade total, motilidade progressiva e espermatozoides rápidos; enquanto o grupo contendo 5 μ M DHA no diluidor de sêmen canino tratado com catalase mostrou-se deletéria à mitocôndria espermática, indicando que esse antioxidante parece ter toxicidade para o espermatozoide na concentração utilizada em nosso experimento. Finalmente, o grupo contendo 5 μ M DHA no diluidor de sêmen canino associado a terapia de vitamina E (0,6mM) mais catalase (300U/mL), diminuíram o estresse oxidativo e lesão de membrana plasmática

Palavras-chave: Espermatozoide; Cão; Peroxidação lipídica; Estresse oxidativo; Ácidos graxos poli-insaturados.

6.1 INTRODUÇÃO

O crescente aumento no interesse em incrementar a eficiência reprodutiva e valor zootécnico de cães, tem levado à maior busca por biotecnologias reprodutivas. Desse modo, a preservação de gametas masculinos é uma valiosa ferramenta, uma vez que o congelamento de sêmen possibilita e facilita seu transporte, armazenamento por períodos prolongados e diminuição de custos [1].

Os espermatozoides são formados dentro dos túbulos seminíferos dos testículos [2] e são células especializadas que possuem baixa quantidade de citoplasma, o que reduz a capacidade antioxidante desta célula e a deixa susceptível a um desequilíbrio oxidativo [3]. Um pré-requisito para o sucesso dos eventos relacionados ao processo de fertilização, como a capacitação espermática, ligação à zona pelúcida e fusão com o oócito, é a presença de membranas íntegras do espermatozoide, bem como morfologia e atividade metabólica

normais, sendo então, considerados viáveis e férteis [4]. A membrana espermática é composta de uma bicamada de lipídeos, principalmente os ácidos graxos poli-insaturados, em especial o ácido docosahexaenoico (DHA), que são de grande importância para a célula, pois conferem as características de fluidez necessária para os eventos associados à permeabilidade espermática e fertilização [5], como motilidade e reação acrossomal [6]. A fluidez da membrana depende de alguns fatores, como temperatura, teor de colesterol e o grau de saturação. Os colesterolos saturados garantem maior rigidez, enquanto que os insaturados conferem maior fluidez a membrana [7], devido à presença das duplas ligações, ou seja, insaturações [8], característica essencial para os eventos reprodutivos. Além disso, estudos indicam que a resistência ao choque pelo frio durante a refrigeração e criopreservação espermática, é influenciada pela composição lipídica da membrana espermática em diversas espécies [9]. Portanto, os ácidos graxos poli-insaturados estão diretamente envolvidos na proteção da membrana durante o processo de criopreservação [10,11]. Sendo assim, uma alternativa seria suplementar as amostras espermáticas com PUFA's durante a criopreservação, protegendo as células contra crioinjúrias [12].

Por outro lado, a elevada porcentagem de PUFA's torna os espermatozoides susceptíveis à atuação de agentes oxidantes, consequentemente levando-os à peroxidação lipídica por possuírem grande quantidade de insaturações, mais facilmente oxidadas [7]. Quando as EROs atacam as duplas ligações dos ácidos graxos insaturados, inicia-se uma reação em cadeia de peroxidação lipídica e, se não for interrompida, leva à perda da permeabilidade da membrana e, consequentemente, da função espermática [13]. Baseado nestas assertivas, o tratamento espermático com PUFA's durante a criopreservação poderia fornecer resultados ambíguos. Resumidamente, se os PUFA's fossem incorporados à membrana espermática, isto a tornaria ainda mais susceptível ao ataque das EROs. Por outro lado, se elas não fossem incorporadas, permanecendo no meio extracelular, haveria uma maior quantidade de substrato para o ataque das EROs, poupando as células espermáticas da lipoperoxidação [8].

Sendo assim, uma alternativa plausível seria a associação entre ácidos graxos poli-insaturados e antioxidantes durante a criopreservação espermática, objetivando a prevenção dos efeitos deletérios dos PUFA's, que seria a peroxidação lipídica frente a um ambiente oxidativo causado pela criopreservação [14]. Vieira et al., (2018) sugerem que, previamente a um tratamento antioxidante, é essencial detectar a ERO na qual o espermatozoide é mais susceptível, com o objetivo de realizar um tratamento antioxidante direcionado à eliminação

desta ERO, já que diferentes antioxidantes (enzimáticos e não enzimáticos) possuem especificidade por determinados agentes oxidantes. Desta forma, Vieira et al., (2018) verificaram que o peróxido de hidrogênio e radical hidroxila foram as EROs mais deletérias para os espermatozoides caninos. Por outro lado, cada ERO foi mais deletéria para uma estrutura espermática diferente. Assim, os autores sugeriram que, para um tratamento antioxidante em espermatozoide de cães ser eficiente, seria necessário uma associação entre antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que debelassem as EROs supracitadas. A catalase e a vitamina E, são exemplos de antioxidantes extremamente eficazes em debelar o peróxido de hidrogênio [16] e o radical hidroxila [17,18], respectivamente.

A vitamina E (α -tocoferol) atua na membrana plasmática, como o maior antioxidante lipossolúvel encontrado em células, prevenindo a reação oxidativa em cadeia [19]. Ele age protegendo a dupla ligação dos ácidos graxos insaturados contra a oxidação em cadeia, doando elétrons para radical hidroxila [20]. O α -tocoferol é o antioxidante mais eficiente para quebrar essa cadeia, reagindo cerca de 200 vezes mais rápido com o radical peroxila, suficiente para impedir a reação deste radical com outro ácido graxo insaturado e, dessa forma, quebrar a cadeia [21]. Ele também pode agir como agente estabilizador da membrana, formando complexos com os fosfolipídios dessa membrana [22].

A catalase, por sua vez, constitui de um sistema enzimático que permite a degradação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio e água [23]. O H_2O_2 é considerado uma ERO extremamente tóxica [24,25] devido à sua habilidade em atravessar a membrana livremente e de inibir as atividades enzimáticas das funções celulares, diminuindo assim as defesas antioxidantes dos espermatozoides [25] e, segundo Vieira et al. (2018), foi a ERO mais nociva para o sêmen canino.

Neste contexto, o objetivo do nosso trabalho foi determinar qual concentração ideal de DHA, com o intuito de testar o tratamento com antioxidantes vitamina E e catalase em amostras criopreservadas em diluidor contendo essa PUFA, e verificar um possível efeito sinérgico destas substâncias durante a criopreservação dos espermatozoides de cães, na homeostase oxidativa e funcionalidade espermática.

6.2. MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1. Animais

O presente experimento foi aprovado pelo Comitê de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo (protocolo número 7693020215). Caso indicação contrária, todos os reagentes foram comprados da Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Foram utilizados oito cães (N = 8; entre 2-6 anos de idade), sendo sete da raça pastor belga malinois e um da raça labrador; peso médio entre 28-32 kg. Os animais eram saudáveis, a dieta fornecida era ração da Royal Canin Max Adult® duas vezes ao dia, eram sexualmente maduros e pertenciam ao Centro de Reprodução e Distribuição de Caninos do 2º Batalhão de Polícia do Exército (Osasco, São Paulo – Brasil). Além disso, o sêmen desses animais eram coletados periodicamente para serem usados na rotina de reprodução assistida do Centro de Reprodução e Distribuição de Cães do Exército.

6.2.2 Delineamento experimental

6.2.2.1 Experimento 1: Efeito da suplementação com ácido graxo poli-insaturado, ácido docosahexaenoico (DHA), no diluidor de sêmen canino

Oito ejaculados (N = 8) foram coletados e divididos em quatro alíquotas e diluídos em meio de criopreservação para cães, em uma concentração final de 100×10^6 espermatozoides por mL, contendo os respectivos tratamentos: grupo controle (0 μ M DHA), 1 μ M DHA, 5 μ M DHA e 10 μ M DHA. Após a divisão das alíquotas em seus respectivos tratamentos, as amostras foram submetidas à criopreservação espermática.

Figura 7. Delineamento do experimento 1.

6.2.2.2 Experimento 2: Efeito da suplementação com antioxidantes (vitamina E e catalase) em amostras de sêmen canino criopreservadas em diluidor contendo DHA

Oito ejaculados ($N = 8$) foram coletados e divididos em quatro alíquotas e diluídas em meio de criopreservação para cães, meio TALP modificado (0,1M NaCl; 0,003M KCl, 0,0004M $MgCl_2$, 0,0003M NaH_2PO_4 , 0,025M $NaHCO_3$; 0,003M $CaCl_2 \cdot H_2O$; 0,3%v/v ácido láctico syruposo; 0,01M Hepes; DHA 5µM; pH 7,4), em uma concentração final de 100×10^6 espermatozoides por mL, e adicionados os seguintes tratamentos antioxidantes: grupo controle, vitamina E 0,6mM, catalase 300U/mL e vitamina E 0,6mM mais catalase 300U/mL. Após a divisão das alíquotas em seus respectivos tratamentos, as amostras foram submetidas à criopreservação espermática.

Figura 8. Delineamento do experimento 2.

6.2.3 Coleta, criopreservação e descongelamento seminal

Todos os animais foram submetidos a coleta de sêmen usando o método de manipulação digital. Previamente ao processamento, cada ejaculado foi avaliado quanto aos padrões de motilidade, vigor e concentração a partir da análise ao microscópio óptico e quanto ao volume em tubo de fundo cônico de 15mL. Para a concentração, o sêmen foi diluído (1:200) em solução salina de formol para contagem de espermatozoides na câmara de Neubauer e a concentração foi expressa em milhões de espermatozoides por mL. As amostras contaminadas (isto é, urina e sangue) ou com motilidade inferior à 70% foram excluídas do estudo.

O sêmen foi centrifugado a 500xg durante 5 minutos na centrífuga Centribio® para a retirada do plasma seminal. Os *pellets* foram divididos em quatro eppendorfs de fundo cônico de 1,5mL e suspensos a uma concentração final de 100×10^6 espermatozoides/mL com diluidor Tris-gema-frutose-ácido cítrico [TRIS-hidroxi-metil-aminometano (Trizma-base) (T-6791 Sigma) 263mM; ácido cítrico mono-hidratado (T-1909) 84,7mM; D-frutose (F-2543) 63mM; gema de ovo 20%; gentamicina 10mg/mL (G-1264); glicerol 5%], em associação aos tratamentos supracitados em ambos os experimentos:

As alíquotas seminais, diluídas em meio de criopreservação e seus respectivos tratamentos, foram acondicionadas em palhetas de 0,5mL (IMV Technologies, França), que, por sua vez, foram alocadas em máquina de criopreservação automatizada TK3000® Compacta (TK Tecnologia em Congelação LTDA – Uberaba-MG – Brasil). Posteriormente, as amostras foram refrigeradas a uma velocidade de 0,25°C/minuto até atingirem 5°C e, depois, a uma velocidade de criopreservação de 20°C/minuto até atingirem -120°C e, posteriormente, imersas em nitrogênio líquido. As amostras foram estocadas em botijão de

nitrogênio líquido e acondicionadas em raques. Uma semana após a criopreservação e armazenamento, as amostras foram descongeladas a 37°C durante 30 segundos e submetidas às avaliações espermáticas, realizadas, de forma similar, para ambos experimentos.

6.2.4 Avaliação espermática pós-descongelamento

Após o descongelamento espermático, as amostras foram avaliadas quanto à cinética espermática, integridade das membranas plasmática e acrossomal, função mitocondrial (atividade e potencial de membrana mitocondrial), integridade de DNA e, por fim, a avaliação do status oxidativo, conforme as descrições abaixo:

6.2.4.1 Análise computadorizada dos padrões de cinética espermática

Os padrões cinéticos foram avaliados usando Análise Espermática Computadorizada (CASA; Hamilton-Thorne®, Ivos 12.3, USA). Para as análises, 6µL de amostra foi usado na câmara de contagem previamente aquecida a 37°C, onde foram avaliadas aproximadamente 1000 células. As seguintes variáveis foram consideradas: motilidade (%), motilidade progressiva (%), VAP (velocidade média de percurso, µm/s; Figura 9), VSL (velocidade retilínea, µm/s; Figura 9), VCL (velocidade curvilínea, µm/s; Figura 9), ALH (amplitude do movimento lateral da cabeça, µm), BCF (frequência de batimento cruzado, Hz), STR (retilinearidade, %) e LIN (linearidade, %). Além desses parâmetros, a velocidade espermática foi classificada em quatro grupos: rápido (%), médio (%), lento (%) e estático (%) [26].

Figura 9. Movimento esquemático da célula espermática realizado pelo CASA (NICHI, 2009).

6.2.4.2 Testes funcionais espermáticos

Os testes funcionais espermáticos foram realizados utilizando a técnica de DAB (3'3 diaminobenzidina) e citometria de fluxo (Guava EasyCyte™ Mini System, Guava® Technologies, 190 Hayward, CA, USA), este último, de acordo com a metodologia descrita por Lucio et al. (2016).

Para avaliar a atividade mitocondrial foi utilizado o ensaio citoquímico da 3'3 Diaminobenzidina (Ensaio DAB), de acordo com a metodologia usada por Losano [28]. Nessa técnica, a 3'3 diaminobenzidina é oxidado pela enzima citocromo C e forma um complexo marrom que é depositado na mitocôndria ativa [29]. Resumidamente, 20 μL de sêmen foi incubado com 20 μL de 3,3 diaminobenzidina em microtubos âmbar por 1 hora em banho-maria a 37°C. Após a incubação, foram feitos esfregaços em lâmina de vidro, no escuro. As placas foram então fixadas em formaldeído a 10% por 10 minutos e secas no ar sob proteção de luz. As análises foram feitas em microscopia de contraste de fase na magnificação de 1000x em óleo de imersão. Cem células foram contadas e classificados dentro de 4 classes, de acordo com a porcentagem de peça intermediária corada (Figura 3): completamente corada, indicando alta atividade mitocondrial (DAB I); mais de 50% da peça intermediária corada, indicando atividade média (DAB II); menos de 50% da peça intermediária não corada, indicando baixa atividade (DAB III); e peça intermediária não corada completamente, indicando ausência de atividade mitocondrial (DAB IV). Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

O equipamento de citometria de fluxo contém um laser azul, que opera a 488nm, e emite uma radiação a laser visível de 20mW. Um total de 10.000 eventos por amostra foram analisados e os dados correspondentes para amarelo (fotodetector PM1 – 583nm), vermelho (fotodetector PM2 – 680nm) e os sinais verdes fluorescentes (fotodetector PM3 - 525nm) foram relatados após a amplificação logarítmica. Todos os dados foram analisados pelo software FlowJo® v10.2. (Flow Cytometry Analysis Software – Tree Star Inc., Ashland, Oregon, USA) [15].

Para a citometria de fluxo, 20µL de sêmen descongelado contendo 2×10^6 espermatozoides de cada palheta foi diluído e lavado duas vezes em 1mL de meio TALP acrescido de 6% de albumina sérica bovina livre de ácidos graxos (BSA EFAF) por centrifugação (200g/3 minutos a 30°C). No final do processo, 80µL do *pellet* foi aspirado em uma concentração de 25×10^6 espermatozoides/mL e transferido para um novo tubo. Para a análise de suscetibilidade de DNA ao estresse ácido, foram utilizados 375.000 espermatozoides (15µL), enquanto que para os outros ensaios, foram utilizados 187.500 (7,5µL).

Membranas plasmática e acrossomal foram avaliadas pelas sondas de *iodeto propidium* (PI) e FITC conjugado com *Pisum sativum agglutinin* (FITC-PSA), respectivamente. Essa associação de fluoróforos divide a população espermática em quatro grupos: membrana intacta e acrossomo intacto (MIAI), membrana intacta e acrossomo lesionado (MIAL), membrana lesionada e acrossomo intacto (MLAI) e membrana lesionada e acrossomo lesionado (MLAL). O procedimento foi realizado com 187.500 células diluídas em TALP modificado e corado com 0,5mg/mL PI em NaCl 0,9% e 100mg/mL FITC-PSA (FITC-PSA L-0770) em solução de azida de sódio a 10% em DPBS. As amostras foram analisadas pelo citômetro de fluxo após 10 minutos, agitada a 488nm e detectada a 630-650nm (PI) a 515-530nm (FITC). O PI emite fluorescência vermelha para membrana plasmática lesionada, enquanto FITC-PSA emite fluorescência verde para acrossomo lesionado.

Potencial de membrana mitocondrial (PMM) foi analisada pela sonda JC-1 (5,5',6,6'- tetracloro-1,1',3,3'-201-cloreto de tetraetil-benzimidazolilcarbocianina; Invitrogen, Eugene, OR, USA). Para realizar essa técnica, 187.500 espermatozoides diluídos em 12,5µL meio TALP, foram adicionados a 0,5µL de sonda fluorescente JC-1 (76,5mM) e incubado a 37°C por 5 minutos. As amostras foram classificadas em porcentagens de potencial de membrana mitocondrial de espermatozoide, como alto (JC-1 alto), intermediário (JC-1

intermediário) e baixo (JC-1 baixo), e analisadas na intensidade de fluorescência logarítmica amarela.

O teste de estabilidade da cromatina foi feito baseado no ensaio da estrutura da cromatina dos espermatozoides (SCSA) escrito por Evenson e Jost (2000) e modificado por Lucio et al. (2016) para cães. Para realizar essa técnica, 375.000 células foram incubadas com tampão TNE (Tris-HCl 0,01M, NaCl 0,15M, EDTA 1mM e água destilada, pH 7,4) e detergente ácido (HCl 0,08M, NaCl 0,15M, Triton X-100 0,1% em água destilada, pH 1,2). Após 30 segundos, laranja de acridina (solução estoque de 6µg/mL) foi adicionada, e cada amostra foi analisada após 5 minutos de incubação a 37°C, agitados a 488nm e detectados a 630-650nm (amarelo) e 515-530nm (verde).

Debris celulares e detritos foram excluídos usando filtro de fluorescência verde/dispersão direta; depois disso, porcentagem de células com alteração de DNA (AO+) foram selecionadas em um histograma αT , que envolve células fluorescentes amarelas/total (total = células de fluorescência amarela + células de fluorescência verde). Para determinar a população AO positiva (AO+), um controle positivo foi incubado com ácido hidrolórico (1,2M em detergente ácido, pH 0,1) por 5 minutos pra induzir a fragmentação de DNA em quase 100% das células, como descrito por De Castro et al. [31]. O controle positivo (100%) foi misturado com o controle negativo (na indução de HCl; 0%) na proporção de 25%, 50% e 75% para obter amostras com essas proporções de células positivas para validação do teste.

6.2.4.3 Avaliação da resistência espermática ao estresse oxidativo

Para avaliar a susceptibilidade da peroxidação lipídica, realizamos o teste de TBARS (Substância Reativa ao Ácido Tiobarbitúrico), de acordo com a metodologia adaptada por Nichi et al. (2007). Nessa técnica foi realizada a incubação das amostras com sulfato de ferro (4mM) e vitamina C (20mM) a 37°C por 90 minutos. Então, após essas induções, ácido tricloroacético a 10% (600mL) foi adicionado. As amostras foram centrifugadas a 20.800xg por 15 minutos a 5°C por precipitação de proteínas e debris. Subsequentemente, 800µL do sobrenadante foram removidos e transferidos para criotubos. Ácido tiobarbitúrico a 1% (TBA; 800µL) foi adicionado aos tubos, cada um foi então

incubado a 95°C em banho-maria por 15 minutos. Nessa reação, malondialdeído (MDA; produto primário da peroxidação lipídica) e reação de TBA, produz um complexo de coloração rosa. Essa coloração foi quantificada no espectrofotômetro (Ultrospec 3300 Pro® Amersham Biosciences, USA) no comprimento de onda de 532nm. Os resultados foram expressos em nanogramas de TBARS/10⁶ espermatozoides.

Na detecção das EROs, realizada apenas na segunda etapa do experimento, foi utilizado uma sonda fluorescente penetrante que, quando oxidada por radicais livres intracelulares, liga-se ao DNA e emite maior intensidade de fluorescência verde (CellROX® green, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). Para esse teste, 187.500 células foram coradas com CellROX® green (concentração final de 5µM) por 30 minutos a 37°C, e PI foi adicionado a concentração final de 6µM, nos últimos 10 minutos. As amostras foram analisadas pela citometria de fluxo, excitada a 488nm, e detectada a 630- 650nm (PI) e 515- 530nm (CellROX® green). Os dados foram analisados a partir da população de célula com: Estresse oxidativo Negativo e Membrana plasmática Íntegra (ENMI), Estresse oxidativo Negativo e Membrana plasmática Lesada (ENML), Estresse oxidativo Positivo e Membrana plasmática Íntegra (EPMI) e Estresse oxidativo Positivo e Membrana plasmática Lesada (EPML), expressos em porcentagem (%).

6.2.5 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados pelo Sistema SAS para Windows (SAS, Institute Inc., Cary, NC, USA, 2000). Os efeitos dos tratamentos (experimento 1: controle x 1µM DHA x 5µM DHA x 10µM DHA; experimento 2 - 5µM DHA mais as concentrações de antioxidantes: controle x vitamina E 0,6mM x catalase 300U/mL x vitamina E 0,6mM mais catalase 300U/mL) foram testados quanto a normalidade dos resíduos (distribuição de Gauss) e homogeneidade das variâncias através do aplicativo *Guided Data Analysis*. A comparação das médias foi realizada por meio do método ANOVA, utilizando o teste LSD (*Least Significant Difference*; comparações múltiplas). Para a descrição dos resultados, significados e seus respectivos erros padrões, foram expressos (média ± erro padrão da média). O nível de significância usado para rejeitar H₀ (hipótese nula) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05 consideramos diferença estatística entre os diferentes grupos.

6.3. RESULTADOS

6.3.1 Experimento 1

Em relação a cinética espermática, foi possível observar que os grupos tratados com 5 μ M e 10 μ M DHA apresentaram maiores porcentagens de células nas variáveis de espermatozoides com motilidade progressiva (Figura 10A) e velocidade rápida (Figura 10B) com resposta semelhante ao grupo controle. Por outro lado, o grupo de 1 μ M DHA demonstrou menores porcentagens de espermatozoides, apresentando diferença significativa comparado ao controle em relação a essas mesmas variáveis (Figura 10A, 10B e Tabela 2). Além disso, no grupo tratado com 10 μ M DHA foi observado menor porcentagem de células com movimento lento (Figura 10C), não apresentando diferença significativa com o grupo controle. Finalmente, foi possível observar menor porcentagem de espermatozoides estáticos no grupo 5 μ M DHA em comparação a todos os outros grupos (Figura 10D). Para as demais variáveis, não foi possível observar diferenças significativas (Tabela 2 e Tabela 3).

Figura 10. Efeito dos tratamentos nas análises computadorizadas de padrões cinéticos de espermatozoides caninos criopreservados com diferentes concentrações de DHA (Controle, DHA 1 μ M, 5 μ M e 10 μ M) em motilidade progressiva dos espermatozoides (A), espermatozoides rápidos (B), espermatozoides lentos (C) e espermatozoides estáticos (D) – São Paulo – 2018. ^{a,b}: letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos com DHA ($p < 0,05$).

Tabela 2 - Efeito das diferentes concentrações do ácido docosahexaenoico (DHA), nas variáveis de cinética espermática de amostras criopreservados de caninos – São Paulo – 2018.

Variáveis	Controle	DHA 1µM	DHA 5µM	DHA 10µM
VAP (µm/s)	80,07±2,66	76,74±1,96	80,16±3,03	78,25±2,38
VSL (µm/s)	69,04±2,42	65,56±2,00	69,35±3,00	66,79±2,37
VCL (µm/s)	127,52±5,35	124,82±5,27	128,11±4,59	126,30±4,33
ALH (µm/s)	7,66±0,32	7,06±0,34	7,25±0,29	7,55±0,30
BCF (Hz)	26,59±1,27	25,92±1,04	26,96±0,90	27,06±0,38
STR (%)	85,25±0,92	84,50±1,59	85,50±1,12	84,50±1,07
LIN (%)	55,50±1,61	54,25±2,45	55,75±1,73	54,75±1,85
Motilidade (%)	27,12±4,00	18,50±2,54	23,25±3,13	26,00±3,51
Progressivo (%)	7,12±1,60 ^a	3,37±0,46 ^b	6,62±1,79 ^{a,b}	6,12±1,11 ^{a,b}
Rápido (%)	7,87±1,69 ^a	3,75±0,62 ^b	7,50±1,95 ^{a,b}	7,00±1,35 ^{a,b}
Médio (%)	19,12±2,65	14,62±1,93	15,87±1,77	18,75±2,42
Lento (%)	53,00±4,80 ^b	67,62±3,42 ^a	69,87±4,38 ^a	55,00±3,41 ^b
Estático (%)	20,12±4,73 ^a	14,00±2,02 ^a	6,75±1,99 ^b	19,12±4,95 ^a

Resultados com diferentes letras (a, b) na mesma linha, indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Tabela 3 - Efeito das diferentes concentrações do ácido docosahexaenoico (DHA) em resposta aos testes funcionais de atividade mitocondrial, potencial de membrana mitocondrial e de integridade das membranas plasmática e acrossomal de sêmen canino submetido à criopreservação – São Paulo – 2018.

Variáveis	Controle	DHA 1µM	DHA 5µM	DHA 10µM
DABI (%)	90,00±1,58	90,00±1,70	88,12±1,53	89,62±1,21
DABII (%)	6,37±1,35	5,00±0,68	6,37±0,68	6,25±0,56
DABIII (%)	2,75±0,67	3,25±1,23	4,12±0,72	3,12±0,91
DABIV (%)	0,87±0,29	1,75±0,56	1,37±0,50	1,00±0,27
JC1ALTO (%)	5,82±3,56	4,30±1,53	7,56±3,45	7,26±2,99
JC1BAIXO (%)	73,14±3,85	78,93±3,02	72,22±6,37	71,62±4,16
JC1INTER (%)	21,02±3,70	16,76±2,82	20,26±3,98	21,13±3,22
SCSA (%)	6,94±1,01	5,10±1,18	5,80±1,67	13,34±7,27
MIAL (%)	2,48±0,94	2,07±0,63	2,16±0,71	2,52±0,95
MLAL (%)	64,20±4,93	65,12±3,50	64,15±3,80	58,17±11,11
MLAI (%)	21,25±3,40	22,20±2,90	22,45±3,89	24,53±5,13
MAI (%)	12,04±3,58	10,60±1,05	11,26±2,51	14,80±5,48

Por fim, não foi possível observar diferenças significativas entre os grupos nas taxas de peroxidação lipídica. Esses resultados demonstraram que nenhuma concentração utilizada causou toxicidade aos espermatozoides, tampouco incremento da lipoperoxidação (Figura 11).

Figura 11. Efeito dos tratamentos com diferentes concentrações de DHA (Controle, DHA 1μM, 5μM e 10μM) nas análises de estresse oxidativo em TBARS de sêmen canino criopreservado (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico) – São Paulo – 2018.

Desta forma, baseado nos resultados encontrados, a concentração que teve menor porcentagem de espermatozoides estáticos, 5μM DHA, foi selecionada para o experimento 2, com o intuito de testar os antioxidantes vitamina E e catalase em amostras criopreservadas em diluidor contendo DHA, durante o processo de criopreservação espermática.

6.3.2. Experimento 2

Em relação as variáveis de cinética espermática, o grupo tratado com vitamina E apresentou maior velocidade média de percurso, VAP (Figura 12A), velocidade linear, VSL (Figura 12B), motilidade espermática total (Figura 12C), motilidade espermática progressiva (Figura 12D) e velocidade de movimento rápido do espermatozoide (Figura 12E), em comparação ao grupo controle. Quando comparados ao grupo tratado com vitamina E, foi possível observar que não apresentaram diferenças significativas nas variáveis descritas acima, entre o grupo tratado com catalase (Figura 12A, 12B, 12C e 12E) e o grupo tratado com a associação de vitamina E mais catalase (Figura 12A, 12B, 12C, 12D e 12E), exceto na motilidade espermática progressiva, onde a porcentagem de espermatozoides do grupo tratado com catalase foi significativamente menor (Figura 12D).

Figura 12. Testes realizados nas amostras seminais criopreservadas de cães avaliadas pelo Sistema Computadorizado de Análise Espermática (CASA): velocidade média de percurso (A), velocidade linear (B), motilidade espermática total (C), motilidade espermática progressiva (D) e velocidade de movimento rápido do espermatozoide (E) – São Paulo – 2018. ^{a,b}: letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos com os antioxidantes ($p < 0,05$).

Quanto a atividade mitocondrial, não houve diferença significativa entre os grupos controle e vitamina E, obtendo-se maior porcentagem de espermatozoides com atividade mitocondrial alta, DABI, comparados aos demais grupos (Figura 13A). Em relação a variável DABII, espermatozoides com atividade mitocondrial intermediária, não houve diferença entre os grupos (Figura 13B, Tabela 4). Em DABIII, espermatozoides com baixa atividade mitocondrial, o grupo catalase e o grupo vitamina E mais catalase apresentaram maior porcentagem de células, demonstrando diferenças significativas com o grupo controle (Figura 13C). E, finalmente, em DABIV, ausência de atividade mitocondrial, observou-se maiores porcentagens de espermatozoides no grupo catalase, apresentando diferenças importantes em relação ao grupo controle (Figura 13D).

Figura 13. Efeito da suplementação com antioxidantes em amostras de sêmen de cão criopreservadas em diluidor contendo 5 μ M DHA (Controle, Vitamina E, Catalase e Vit E: Vitamina E + Cat: Catalase) na atividade mitocondrial alta (A), média (B), baixa (C) e ausente (D) – São Paulo – 2018. ^{a,b}: letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos com os antioxidantes vitamina E, catalase e sua combinação ($p < 0,05$).

Tabela 4 – Efeito dos tratamentos antioxidantes vitamina E, catalase e a combinação de ambos em resposta aos testes funcionais de atividade mitocondrial, potencial de membrana mitocondrial e de integridade das membranas plasmática e acrossomal de sêmen canino submetido à criopreservação em diluidor contendo DHA– São Paulo – 2018.

Variáveis	Controle	Vitamina E	Catalase	Vit E + Cat
DABI (%)	56,00±4,39 ^a	52,28±3,84 ^a	38,00±3,61 ^b	38,28±6,83 ^b
DABII (%)	28,57±4,37	28,57±3,08	28,62±3,63	31,87±4,36
DABIII (%)	1,28±0,56 ^b	2,86±0,55 ^{ab}	4,50±1,21 ^a	4,37±0,84 ^a
DABIV (%)	14,14±3,91 ^b	16,28±4,15 ^{ab}	28,87±3,99 ^a	29,12±7,21 ^{ab}
JC1ALTO (%)	36,80±8,99	38,66±8,49	32,43±5,44	28,09±3,96
JC1BAIXO (%)	35,74±2,82	38,26±3,61	44,94±3,91	42,26±2,32
JC1INTER (%)	27,46±7,54	32,03±7,22	22,66±3,88	29,66±3,98
SCSA (%)	1,36±0,25	1,14±0,32	1,56±0,37	2,01±0,81
MLAL (%)	33,67±2,56	30,78±2,48	35,74±3,26	37,12±6,63
MIAL (%)	2,86±0,32	2,71±0,12	3,44±0,42	3,16±0,39
MLAI (%)	17,81±2,06	18,94±3,33	18,54±2,61	20,25±2,92
MAI (%)	45,68±3,28	50,40±3,09	42,26±4,40	44,21±3,62

Resultados com diferentes letras (a, b) na mesma linha, indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Finalmente, foi possível verificar no grupo vitamina E mais catalase maior percentagem de espermatozoides, apresentando diferença significativa em relação ao grupo controle, referente ao status oxidativo da variável ENMI (Estresse oxidativo Negativo e Membrana plasmática Íntegra – Figura 14A). As demais variáveis, EPML (Estresse oxidativo Positivo e Membrana plasmática Lesada – Figura 14B), EPMI (Estresse oxidativo Positivo e Membrana plasmática Íntegra – Figura 14C), ENML (Estresse oxidativo Negativo e Membrana plasmática Lesada – Figura 14D) e TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico – Figura 14E), não tiveram diferenças significativas (Tabela 5).

Figura 14. Status oxidativo das amostras de sêmen de cão criopreservadas em diluidor contendo 5 μ M de DHA (Controle, Vitamina E, Catalase e Vit E: Vitamina E + Cat: Catalase), ENMI: Estresse oxidativo Negativo e Membrana plasmática Íntegra (A), EPML: Estresse oxidativo Positivo e Membrana plasmática Lesada (B), EPMI: Estresse oxidativo Positivo e Membrana plasmática Íntegra (C), ENML: Estresse oxidativo Negativo e Membrana plasmática Lesada (D) e TBARS: Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (E) – São Paulo – 2018. ^{a,b}: letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos com os antioxidantes vitamina E, Catalase e sua combinação ($p < 0,05$).

Tabela 5 – Efeito dos tratamentos antioxidantes (Controle, vitamina E, catalase e vitamina E mais catalase) nas variáveis de status oxidativo das amostras de sêmen de cão criopreservadas em diluidor contendo DHA – São Paulo – 2018.

Variáveis	Controle	Vitamina E	Catalase	Vit E + Cat
ENMI (%)	3,65±0,83 ^b	8,81±2,12 ^{ab}	8,32±1,76 ^{ab}	10,55±3,97 ^a
EPML (%)	9,62±1,50	7,23±1,23	11,80±6,60	7,13±2,90
EPMI (%)	9,48±2,96	10,04±2,53	7,19±1,95	7,33±1,91
ENML (%)	77,22±4,70	73,91±4,21	72,70±5,64	75,01±4,66
TBARS (ng/10 ⁶ sptz)	59,83±7,93	49,90±5,15	48,69±5,66	46,38±3,05

Resultados com diferentes letras (a, b) na mesma linha, indicam diferenças significativas (p<0,05).

6.4. DISCUSSÃO

Os espermatozoides são particularmente susceptíveis ao ataque de EROs devido ao seu citoplasma reduzido e, consequentemente, pela quantidade limitada de antioxidante enzimático intracelular [33]. Além disso, para a criopreservação do sêmen de cães é necessária a retirada do plasma seminal, e com isso são removidos importantes antioxidantes presentes nessa substância [34,35]. Outro ponto importante é que a membrana do espermatozoide é rica em PUFA, o que permite uma maior fluidez de membrana e melhora a resistência ao processo de criopreservação. No entanto, isto o torna mais suscetível ao estresse oxidativo uma vez que as ligações duplas (insaturações) são mais facilmente clivadas pelas EROs [32]. Em nosso estudo, avaliamos o efeito sinérgico da associação entre PUFA e antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos adicionados ao diluidor de sêmen de cães, com o intuito de prevenir a peroxidação lipídica exacerbada, causada pela adição desses ácidos graxos [36].

Em nosso primeiro experimento, avaliamos o efeito das diferentes concentrações de DHA adicionado ao diluidor de sêmen canino, para promover aumento da proteção da célula, objetivando prevenir crioinjúrias espermáticas e, consequentemente, melhorar a qualidade dos espermatozoides caninos pós-criopreservação. Como no trabalho de Nichi, (2009) na espécie bovina, em nosso experimento optou-se por utilizar doses de até 10µM para evitar o efeito exacerbado da peroxidação lipídica.

Observamos diferenças significativas na cinética espermática entre os grupos tratados com as diferentes concentrações de DHA utilizadas (1 μ M, 5 μ M e 10 μ M). As concentrações de 5 μ M e 10 μ M DHA demonstraram respostas semelhantes ao grupo controle com melhores resultados nas variáveis motilidade progressiva e velocidade rápida, enquanto 1 μ M DHA demonstrou-se prejudicial ou ineficaz às células. A concentração de 5 μ M DHA destacou-se com melhores resultados, por apresentar menores porcentagens de espermatozoides estáticos, ao contrário dos demais grupos. Melhores resultados também foram obtidos utilizando DHA, nos estudos de Nichi (2009), Kaka et al. (2015) e de Losano et al. (2018), com sêmen de touros coletados do epidídimo. Aitken et al. (2006), incubou amostras de sêmen humano, com diferentes concentrações de DHA: 7,2 μ M, 14,4 μ M, 28,8 μ M, 57,6 μ M e 115,2 μ M, verificando que não houve impacto significativo na viabilidade espermática, com exceção da maior concentração testada, a de 115,2 μ M que foi citotóxica. Comparando-se as concentrações de DHA testadas em nosso trabalho, optou-se por adicionar ao diluidor 5 μ M DHA.

Para adicionar o antioxidante ao diluidor de sêmen canino contendo DHA, com o objetivo de aumentar a proteção da célula contra o choque frio e diminuir a peroxidação lipídica [39], a escolha do antioxidante ideal é essencial, uma vez que cada ERO é preferencialmente neutralizada por diferentes sistemas de antioxidantes [40]. Em um estudo anterior, realizado por nossa equipe em espermatozoides caninos sem o plasma seminal, o H₂O₂ reduziu dramaticamente o potencial da membrana mitocondrial, foi deletério para a cinética espermática (motilidade total e progressiva) e para as membranas plasmática/acrossomal. Além disto, o radical hidroxila reduziu a atividade mitocondrial e aumentou a fragmentação do DNA. Ambas EROs foram nocivas para o sêmen canino sem o plasma seminal, condição necessária para a criopreservação do sêmen nesta espécie. Por esse motivo optou-se pela terapia antioxidante enzimática como a glutathione peroxidase/redutase ou catalase, associada a antioxidantes não-enzimáticos como o α -tocoferol ou ácido ascórbico [15].

A vitamina E é considerada o maior antioxidante de membrana lipossolúvel encontrado em células que consegue quebrar a reação em cadeia causada pela peroxidação lipídica, pela formação de produtos não radicais (BAKER et al., 1996; BURTON et al., 1985; SIES, 1993) e, a catalase, é uma das enzimas mais eficientes catalisadoras da reação que transforma o H₂O₂ em água mais oxigênio, evitando a formação do radical mais prejudicial ao

espermatozoide, o radical hidroxila (BAKER et al., 1996; BENDICH, 1990). Já a vitamina C, pode atuar numa retroalimentação de íons de ferro para a reação de Fenton levando a um aumento na conversão de peróxido de hidrogênio em radical hidroxila, podendo levar a um quadro pró-oxidativo [43].

Tanto a catalase como a glutathiona peroxidase (GPx) possuem a mesma função de decompor as moléculas de peróxido de hidrogênio com a formação de água e oxigênio, controlando assim a cadeia de produção de EROs (BAKER et al., 1996). A catalase atua como frente única de ação uma vez que ela é capaz por si só de decompor as moléculas de peróxido de hidrogênio. De fato, acredita-se que esta enzima possa ter um papel importante frente a um estresse oxidativo agudo [44]. Por outro lado, para que a glutathiona peroxidase atue é necessária a presença de uma maquinaria complexa que envolve substâncias como a glutathiona reduzida (GSH), glutathiona oxidada (GSSG) e NADPH [45]. Neste caso, acredita-se que a GPx tenha uma função maior quando da presença de um estresse crônico em que é possível que as substâncias necessárias possam ser transcritas, produzidas e ativadas. Diante do exposto, optou-se pela utilização do antioxidante enzimático catalase e do não enzimático vitamina E, no segundo experimento deste trabalho.

Para que o tratamento antioxidante seja eficiente é necessário que o sistema biológico em questão esteja sob estresse oxidativo, pois se isso não estiver ocorrendo, um tratamento antioxidante, mesmo em concentrações baixas, podem não ser eficientes ou até mesmo ser deletérias, já que as EROs possuem papel fisiológico fundamental para o espermatozoide [46]. Uma possível explicação para diferentes resultados, tanto positivos quanto negativos, para os tratamentos de sêmen com antioxidantes, é a quantidade de antioxidante utilizada em cada trabalho [8]. Se presentes em concentrações mais altas que os substratos oxidáveis, retardam significativamente a oxidação do substrato, levando a efeitos deletérios aos eventos fisiológicos [47]. Se em quantidades insuficientes pode não apresentar os efeitos desejados [8]. Fundamentamos nosso estudo no fato de que uma quantidade ideal poderia incrementar, de forma significativa, a qualidade espermática, evitando os danos causados pelas EROs, conforme sinalizado por Nichi (2009) na espécie bovina. Portanto, foram utilizadas as concentrações de antioxidantes descritas em trabalhos já realizados com sucesso na espécie canina, utilizando 0,6mM vitamina E [48] e 300U/mL catalase [1,48].

Em todos os testes realizados de cinética espermática que apresentaram diferença significativa (velocidade média de percurso, velocidade linear, porcentagem de células

móveis, porcentagem de células com motilidade progressiva, velocidade de espermatozoide com movimento rápido) realizados em nosso trabalho, o grupo vitamina E (0,6mM) foi o que teve melhores resultados. Sobrinho, (2009) utilizou vitamina E no diluidor de sêmen canino nas concentrações 1mM, 5mM e 10mM e não apresentou diferenças importantes entre os grupos tratados e o controle, provavelmente pelas concentrações serem muito superiores do que as utilizadas em nosso trabalho. No entanto, comparações podem ser enviesadas uma vez que no presente estudo houve, em combinação à vitamina E, a adição de DHA no diluidor do sêmen.

Nosso estudo corroborou com Beconi et al., (1993) em bovinos, que adicionou vitamina E ao diluidor na concentração de 1mg/mL e concluiu que houve proteção sobre a membrana plasmática em sêmen de boa qualidade, preservando a atividade metabólica e a viabilidade celular. Da mesma forma, Peña et al., (2003), em suínos, mostraram um efeito protetivo no descongelamento do sêmen, quando adicionado vitamina E ao diluidor a uma concentração de $200\mu\text{M l}^{-1}$, aumentando motilidade e viabilidade. No entanto, Dad et al., (2006), na espécie canina, mostraram resultados diferentes aos nossos, pois tiveram benefícios limitados na qualidade pós-descongelamento em sêmen utilizando a vitamina E, e relatam resultado já esperado por esse antioxidante agir na quebra de cadeias e não como sequestrador.

Em cães, Michael et al., (2007), obtiveram valores maiores para motilidade total, movimento progressivo (RSF – *rapid steady forward*) e viabilidade quando acrescentaram vitamina E na metade da concentração que utilizamos em nosso experimento (0,3mM), mostrando diferença significativa na motilidade total do sêmen comparando com o controle. O’Flaherty; Beconi; Beorlegyui, (1997) estudando a espécie bovina, mostraram um efeito protetor na integridade da membrana plasmática dos espermatozoides durante o ultracongelamento, com a adição de vitamina E.

Por outro lado, Nichi 2009, apresentou efeito negativo na motilidade espermática de touros nas três concentrações de vitamina E testadas por ele 0,5mM, 1,5mM e 2,5mM, sendo as duas primeiras concentrações, com resultados para motilidade significativamente menor em relação ao controle.

A vitamina E é considerada uma linha única de defesa, por não precisar de nenhuma outra substância associada para interromper a reação oxidativa em cadeia, devido a

sua natureza lipídica em penetrar as membranas biológicas [53,54]. Ela age, principalmente, através da destruição do radical hidroxila [17,18]. Na concentração utilizada em nossa pesquisa, a vitamina E desempenhou importante papel protetor sobre a mitocôndria, sendo demonstrada nas variáveis de cinética espermática, principalmente na motilidade progressiva do espermatozoide.

Os efeitos contraditórios podem estar relacionados a diferentes susceptibilidades a peroxidação lipídica entre as espécies, principalmente relacionados aos diferentes antioxidantes e/ou composição do plasma seminal. Além disso, o estresse oxidativo provavelmente afeta várias estruturas das células espermáticas de forma diferente, além da variação de espécie para espécie. O efeito da vitamina E pode também variar com a dose considerada de alta capacidade de absorção de radicais hidroxila para atuar, na verdade, como um estimulador de oxidação, ao invés de um antioxidante [50].

Em nosso trabalho, quando comparados com o controle, obtivemos melhores resultados para cinética espermática com o grupo que foi adicionado apenas o antioxidante não enzimático vitamina E, como nas motilidades total, progressiva e rápida, bem como na velocidade média de percurso (VAP) e velocidade linear (VSL). Nas análises de motilidade total, movimento progressivo e viabilidade realizada por Michael et al., (2007) também em sêmen de cães, o grupo tratado com catalase apresentou maior porcentagem de células com motilidade progressiva comparado com o controle. Eles usaram a mesma concentração de catalase do que em nosso estudo (300U/mL), que também foi a mesma utilizada em bovinos por Bilodeau et al., (2002), que tiveram melhora na motilidade espermática. O trabalho de Lopes, (2010) com cães, mostrou melhores resultados com a catalase comparando com os demais antioxidantes testados em seu estudo (SOD, catalase, vitamina C, vitamina E, SOD mais catalase e vitamina C mais vitamina E) nos grupos fértil, nas variáveis motilidade total, motilidade progressiva e espermatozoides rápidos e; subfértil nas variáveis motilidade progressiva, velocidade média de percurso (VAP) e espermatozoides rápidos.

Hatamoto et al., (2006) em um estudo, descreveu que a catalase não foi observada em níveis detectáveis nas amostras de plasma seminal no sêmen de cães, corroborando com Lopes, (2010) e Srtzezek et al., (2009). Também não foi encontrado em outras espécies como em touros [8] e cachacos [58]. Em outro estudo, o efeito positivo da adição da catalase foi atribuído a esse provável déficit [1]. Por outro lado, Kawakami et al., (2007), referiram que o plasma seminal de cães contém glutathione peroxidase e catalase, principais responsáveis pela

erradicação dessas EROs. Mas como já descrito em nosso trabalho, para o processo de criopreservação, o plasma é removido e, junto, os antioxidantes protetores nele contidos.

Em geral, os grupos tratados com catalase, com (DABI e DABIII) ou sem (DABIV) a associação de vitamina E apresentaram menor atividade mitocondrial. Em relação a porcentagem de espermatozoides DABIV, o grupo apenas com catalase também demonstrou diferenças importantes, com maiores porcentagens de células com ausência de atividade mitocondrial. Diante disso, observamos que sempre que a catalase foi adicionada ao tratamento, houve efeito deletério na mitocôndria, na atividade mitocondrial. Isso pode ter ocorrido devido à concentração excessiva da catalase, pois antioxidantes em quantidades elevadas também são prejudiciais aos espermatozoides. Tais resultados corroboram com Nichi, (2009) que, em touros, não obteve resultados satisfatórios para atividade mitocondrial e, com Silva, (2011) que com caprinos, em seu estudo, a catalase também apresentou efeitos deletérios. Este último sugere que as técnicas utilizadas para detecção de catalase no sêmen em estudos anteriores, possuem diferentes sensibilidades, o que pode ser responsável pela grande variação nas concentrações de catalase já relatadas anteriormente, observada em sêmen de diferentes espécies. O autor presume que as concentrações de catalase seriam relativamente baixas nas espécies em que ela não foi detectada no sêmen. Isso explicaria o efeito deletério da catalase, também encontrados em nosso estudo, indicando que a espécie canina pode ser sensível ao tratamento com esse antioxidante. A ausência de efeitos desejados para algumas variáveis avaliadas em nosso experimento, pode ter ocorrido pela suplementação com concentrações inadequadas (excessivas ou insuficientes).

Quanto ao status oxidativo, houve uma melhora quanto a membrana plasmática e diminuição no estresse oxidativo nas amostras tratadas com a combinação vitamina E e catalase, refletido por uma maior porcentagem de células ENMI (Estresse Negativo e Membrana plasmática Íntegra) em relação aos outros grupos, sendo o grupo controle com os piores resultados, ou seja, menor porcentagem de células. Pode-se observar que o meio acrescido de vitamina E mais catalase proporcionou maior proteção oxidativa e integridade de membrana plasmática aos espermatozoides, com um efeito potencializado pela associação dos dois antioxidantes. Talvez, esse fato seja devido a remoção de H_2O_2 e radical hidroxila do meio, prevenindo assim, a capacitação e reação acrossomal prematuras, que podem ocasionar a morte espermática, como Maia et al., (2009) descreveram em seu estudo em ovinos [62]. O sêmen de suínos possuem alta concentração de PUFA's em sua membrana e tem baixa

capacidade antioxidante no plasma seminal, e talvez por esse motivo, parece ser um dos mais sensíveis aos danos oxidativos, apresentando bons resultados no pós-descongelamento quando acrescentado a vitamina E no diluente [63], assim como ocorreu em nosso experimento na espécie canina também com a vitamina E.

Não verificamos efeito significativos sobre a susceptibilidade dos espermatozoides ao estresse oxidativo (TBARS) após o descongelamento do sêmen em nosso experimento. Concordando com o trabalho de Sobrinho (2009) na espécie canina, os resultados de TBARS devem ser avaliados com cautela, pois a susceptibilidade dos espermatozoides ao estresse oxidativo é uma técnica de desafio, ou seja, os espermatozoides são submetidos a concentrações excessivas de EROs, não sendo uma característica fisiológica da célula.

Assim como no estudo de Nichi, (2009) com touros, não esperávamos o efeito adverso da catalase em nosso trabalho. Uma hipótese desse autor para explicar este resultado seria a inibição de processos fisiológicos por uma possível concentração excessiva de antioxidante utilizada, o que inibiria os processos fisiológicos nos mais diversos mecanismos da célula espermática. Traçando um paralelo com o seu estudo na espécie bovina, o que poderia estar associado a esta hipótese, é o fato de que alguns estudos anteriores não encontraram catalase, ou se presente, estavam em baixas concentrações, não apenas em touros, mas também em sêmen canino. Desse modo, a adição desse antioxidante seria diferente do meio no qual os espermatozoides caninos estariam preparados e adaptados.

Como conclusão, nossos dados mostraram que antioxidantes em amostras espermáticas criopreservadas em diluidor de sêmen canino contendo 5 μ M DHA, apresentaram efeitos benéficos desejados para motilidade, onde a vitamina E (0,6mM) causou efeito protetor significativo; e para os dois antioxidantes associados vitamina E (0,6mM) mais catalase (300U/mL), que diminuíram o estresse oxidativo e lesão de membrana plasmática.

REFERÊNCIAS

- [1] Michael A, Alexopoulos C, Pontiki E, Hadjipavlou-Litina D, Saratsis P, Boscos C. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology* 2007;68:204–12.
- [2] Garner D, HAFEZ E. Espermatozoides e plasma seminal. In: Manole, editor. *Reprodução Anim.* 7th ed., São Paulo: 2004, p. 97–110.
- [3] Lamirande E de, Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa: I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J Androl* 1992;13:368–78.
- [4] Arruda RP De, Celeghini ECC, Andrade a FC, Garcia a R, Raphael CF, Souza LWO. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. 1 Simpósio Int Reprodução Anim Apl 2005:166–79.
- [5] Mandal R, Badyakar D, Chakrabarty J. Role of Membrane Lipid Fatty Acids in Sperm Cryopreservation. *Hindawi Publ Corp* 2014;2014.
- [6] Rooke JA, Shao CC, Speake BK. Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and in vitro characteristics of semen. *Reproduction* 2001;121:315–22.
- [7] Andrade ER, Melo-Sterza FA, Seneda MM, Alfieri AA. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. *Rev Bras Reprodução Anim* 2010;34:79–85.
- [8] Nichi M. Efeito do tratamento com antioxidantes e ácidos graxos poli-insaturados em amostras espermáticas epididimárias de touros. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2009.
- [9] Parks JE, Lynch D V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology* 1992;29:255–66.
- [10] Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril* 2003;79:829–43.
- [11] Lenzi A, Gandini L, Picardo M, Tramer F, Sandri G, Panfili E. Lipoperoxidation Damage of Spermatozoa Polyunsaturated. *Front Biosci* V5 2000:1–15.
- [12] Losano, JDA, Angrimani D, Rui B, Bicudo L, Dalmazzo A, Silva B, et al. The addition of docosahexaenoic acid (DHA) and antioxidants (glutathione peroxidase and superoxide dismutase) in extenders to epididymal sperm cryopreservation in bulls. *Zygote* 2018;26:199–206.

- [13] Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction* 2001;122:497–506.
- [14] Losano JDA, Angrimani DSR, Dalmazzo A, Rocha CC, Brito MM, Perez EGA, et al. Effect of Vitamin E and Polyunsaturated Fatty Acids on Cryopreserved Sperm Quality in *Bos taurus* Bulls Under Testicular Heat Stress. *Anim Biotechnol* 2018;29:100–9.
- [15] Vieira N de MG, Losano JD de A, Angrimani D de SR, Kawai GKV, Bicudo L de C, Rui BR, et al. Induced sperm oxidative stress in dogs: Susceptibility against different reactive oxygen species and protective role of seminal plasma. *Theriogenology* 2018;108:39–45.
- [16] Nordberg J, Arnér ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system1 1This review is based on the licentiate thesis “Thioredoxin reductase—interactions with the redox active compounds 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and lipoic acid” by Jonas Nordberg,. *Free Radic Biol Med* 2001;31:1287–312.
- [17] Halliwell B, Gutteridge J. *Free radicals in biology and medicine*. Pergamon: 1985.
- [18] Bjorneboe A, Bjorneboe G-E, Drevon CA. Absorption , Transport and Distribution of Vitamin E. *J Nutr* 1990;120:233–42.
- [19] Matés JM. Erratum to ‘Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology.’ *Toxicology* 2001;163:219.
- [20] Bendich A. *Antioxidant Micronutrients and Immune Responses*. New York Acad Sci - Ann 1990;587:168–80.
- [21] Burton GW, Doba T, Gabe EJ, Hughes L, Lee FL, Prasad L, et al. Autoxidation of Biological Molecules. 4. Maximizing the Antioxidant Activity of Phenols. *J Am Chem Soc* 1985;107:7053–65.
- [22] Bradford A, Atkinson J, Fuller N, Rand RP. The effect of vitamin E on the structure of membrane lipid assemblies. *J Lipid Res* 2003;44:1940–5.
- [23] Griveau JF, Lannou D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl* 1997;20:61–9.
- [24] Aitken RJ, Buckingham D, Harkiss D. Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 1993;97:441–50.

- [25] Griveau JF, Dumont E, Renard P, Callegari JP, Le Lannou D. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. *Reproduction* 1995;103:17–26.
- [26] Verstegen J, Iguer-Ouada M, Onclin K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 2002;57:149–79.
- [27] Lucio CF, Regazzi FM, Silva LCG, Angrimani DSR, Nichi M, Vannucchi CI. Oxidative stress at different stages of two-step semen cryopreservation procedures in dogs. *Theriogenology* 2016;85:1568–75.
- [28] Losano JDA, Angrimani DSR, Pereira RJG, Rocha AM, Criscuolo TS, Barnabe VH, et al. Utilisation of sperm-binding assay combined with computer-assisted sperm analysis to evaluate frozen-thawed bull semen. *Andrologia* 2015;47:77–84.
- [29] Hrudka F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. *Int J Androl* 1987;10:809–28.
- [30] Evenson D, Jost L. Sperm Chromatin Structure Assay for Fertility Assessment. *Methods Cell Sci* 2000;22:169–89.
- [31] De Castro LS, De Assis PM, Siqueira AFP, Hamilton TRS, Mendes CM, Losano JDA, et al. Sperm oxidative stress is detrimental to embryo development: A dose-dependent study model and a new and more sensitive oxidative status evaluation. *Oxid Med Cell Longev* 2016;2016.
- [32] Nichi M, Goovaerts IGF, Cortada CNM, Barnabe VH, De Clercq JBP, Bols PEJ. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 °C. *Theriogenology* 2007;67:334–40.
- [33] Aitken RJ, Sawyer D. The human spermatozoon--not waving but drowning. *Adv Exp Med Biol* 2003;518:85–98.
- [34] Lúcio CF. Efeito da glutatona reduzida (GSH) na criopreservação de espermatozoides da espécie canina: avaliação in vitro e in vivo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2012.
- [35] Lecewicz M, Strzeżek R, Kordan W, Majewska A. Effect of extender supplementation with low-molecular-weight antioxidants on selected quality parameters of cryopreserved canine spermatozoa. *J Vet Res* 2018;62:221–7.

- [36] Strzezek R, Koziorowska-Gilun M, Stawiszyńska M. Cryopreservation of canine semen: The effect of two extender variants on the quality and antioxidant properties of spermatozoa. *Pol J Vet Sci* 2012;15:721–6.
- [37] Kaka A, Haron W, Yusoff R, Yimer N, Khumran AM, Sarsaifi K, et al. Effect of Docosahexaenoic acid on Frozen- thawed Quality of Bull Semen in BioXcell® Extender. *Reprod Fertil Dev* 2015:A-F.
- [38] Aitken RJ, Wingate JK, Iuliis GN De, Koppers AJ, McLaughlin EA. Cis-Unsaturated Fatty Acids Stimulate Reactive Oxygen Species Generation and Lipid Peroxidation in Human Spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:4154–63.
- [39] Kaka A, Haron W, Leghari RA, Memon I, Kaka U, Mirani AH, et al. Effect of in-vitro supplementation of polyunsaturated fatty acids on frozen- thawed bull sperm characteristics using 2016;5:399–405.
- [40] Agarwal A, Virk G, Ong C, du Plessis SS. Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. *World J Mens Health* 2014;32:1.
- [41] Baker, H, W G, Brindle J, Irvine, D S, Aitken, R J. Protective effect of antioxidants on the impairment of sperm motility by activated polymorphonuclear leukocytes. *Fertil Steril* 1996;65:411–9.
- [42] SIES H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 1993;215:213–9.
- [43] Aitken RJ, Harkiss D, Buckingham D. Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. *J Reprod Fertil* 1993;98:257–65.
- [44] Halliwell B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* 1991;91.
- [45] Gadea J, Molla M, Selles E, Marco MA, Garcia-Vazquez FA, Gardon JC. Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Cryobiology* 2011;62:40–6.
- [46] Sobrinho CDAB. Efeito do tratamento com antioxidantes na qualidade de espermatozoides criopreservados de cães. 2009.
- [47] Halliwell B, Gutteridge J. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Press, Clarendon: 1999.
- [48] Lopes B de S. Efeito da adição e/ou suplementação de antioxidante no processo de congelamento/descongelamento de sêmen de cães férteis e subférteis. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, 2010.

- [49] Beconi MT, Francia CR, Mora NG, Affranchino MA. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. *Theriogenology* 1993;40:841–51.
- [50] Peña FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez Martinez H. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Anim Reprod Sci* 2003;78:85–98.
- [51] Dad S, Bisby RH, Clark IP, Parker AW. Formation of singlet oxygen from solutions of vitamin E. *Free Radic Res* 2006;40:333–8.
- [52] O’flaherty C, Beconi M, Beorlegui N. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. *Andrologia* 1997;29:269–275.
- [53] Fariss MW. Cadmium toxicity: unique cytoprotective properties of alpha tocopheryl succinate in hepatocytes. *Toxicology* 1991;69:63–77.
- [54] Matés JM, Sánchez-Jiménez FM. Role of Reactive Oxygen Species in Apoptosis: Implications for Cancer Therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 2000;32:157–70.
- [55] Bilodeau JF, Blanchette S, Cormier N, Sirard MA. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: Protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. *Theriogenology* 2002;57:1105– 22.
- [56] Hatamoto LK, Baptista Sobrinho CA, Nichi M, Barnabe VH, Barnabe RC, Cortada CNM. Effects of dexamethasone treatment (to mimic stress) and Vitamin E oral supplementation on the spermogram and on seminal plasma spontaneous lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in dogs. *Theriogenology* 2006;66:1610– 4.
- [57] Srtzezek R, Koziorowska-Gilun M, Kowalówka J, Srtzezek J. Characteristics of antioxidant system in dog semen. *Pol J Vet Sci* 2009;12:55–60.
- [58] Foote RH. Catalase content of rabbit, ram, bull and boar semen. *J Anim Sci* 1962;21:966–8.
- [59] Angrimani DSR, Lucio CF, Veiga GAL, Silva LCG, Regazzi FM, Nichi M, et al. Sperm maturation in dogs: sperm profile and enzymatic antioxidant status in ejaculated and epididymal spermatozoa. *Andrologia* 2014;46:814–9.

-
- [60] Kawakami E, Takemura A, Sakuma M, Takano M, Hirano T, Hori T, et al. Superoxide dismutase and catalase activities in the seminal plasma of normozoospermic and asthenozoospermic Beagles. *J Vet Med Sci* 2007;69:133–6.
  - [61] Silva ROC da. Efeito da adição de antioxidantes enzimáticos na criopreservação do sêmen caprino Efeito da adição de antioxidantes enzimáticos na criopreservação do sêmen caprino. 2011.
  - [62] Maia M da S, Bicudo SD, Azevedo HC, Sicherle CC, de Sousa DB, Rodello L. Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. *Small Rumin Res* 2009;85:85–90.
  - [63] Breininger E, Beorlegui NB, O’Flaherty CM, Beconi MT. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. *Theriogenology* 2005;63:2126–35.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Concluimos que:

1) O plasma seminal tem um efeito protetor contra a peroxidação lipídica e às lesões mitocondriais em circunstâncias de indução do estresse oxidativo. O H_2O_2 e o radical hidroxil foram EROs as mais nocivas para o espermatozoide canino.

2) A utilização do ácido docosahexaenoico no diluidor de sêmen canino na concentração de $5\mu M$ DHA, associado à terapia antioxidante em amostras espermáticas de cães submetidas à criopreservação, apresentaram efeitos benéficos nos parâmetros referentes à cinética, no qual a vitamina E ($0,6mM$) causou efeito protetor significativo; a catalase na concentração usada de $300U/mL$ foi deletéria e; os dois antioxidantes associados vitamina E ($0,6mM$) mais catalase ($300U/mL$), diminuíram o estresse oxidativo e lesão de membrana plasmática.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABINPET. **Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação**. Disponível em: <<http://abinpet.org.br/mercado/>>.
- AGARWAL, A. et al. Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. **The World Journal of Men's Health**, v. 32, n. 1, p. 1, 2014.
- AGARWAL, A.; DURAIRAJANAYAGAM, D.; DU PLESSIS, S. S. Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. **Reproductive biology and endocrinology: RB&E**, v. 12, p. 112, 2014.
- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 3, p. 1–21, 2005.
- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SIKKA, S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. **Current Opinion in Obstetrics & Gynecology**, v. 18, n. 3, p. 325–332, 2006.
- AGARWAL, A.; SALEH, R. A.; BEDAIWY, M. A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and Sterility**, v. 79, n. 4, p. 829–843, 2003.
- AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Revisão. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 623–628, 2007.
- AITKEN, R. J.; IRVINE, D. S.; WU, F. C. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 164, n. 2, p. 542–551, 1991.
- AITKEN, R. J. A free radical theory of male infertility. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 6, n. 1, p. 19–23; discussion 23–4, 1994.
- AITKEN, R. J. et al. Superoxide dismutase in human sperm suspensions: Relationship with cellular composition, oxidative stress, and sperm function. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 21, n. 4, p. 495–504, 1996.
- AITKEN, R. J. et al. Cis-Unsaturated Fatty Acids Stimulate Reactive Oxygen Species Generation and Lipid Peroxidation in Human Spermatozoa. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 91, n. 10, p. 4154–4163, 2006.
- AITKEN, R. J. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. **Molecular Reproduction and Development**, v. 84, n. 10, p. 1039–1052, 2017.
- AITKEN, R. J.; BUCKINGHAM, D.; HARKISS, D. Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 97, n. April, p. 441–450, 1993.
- AITKEN, R. J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, n. 1, p. 257–265, 1993.

- AITKEN, R. J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. **Reproduction**, v. 122, n. 4, p. 497–506, 2001.
- AITKEN, R. J.; SAWYER, D. The human spermatozoon-not waving but drowning. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 518, p. 85–98, 2003.
- ALCANTAR-RODRIGUEZ, A.; MEDRANO, A. The effect of cooling to different subzero temperatures on dog sperm cryosurvival. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. 3, p. 422–428, 2017.
- ALVARENGA, M, L. et al. Suplementação do meio de refrigeração espermática com vitamina C e catalase em sêmen obtido de cães jovens e idosos. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, n. 4, p. 673–682, 2013.
- AMANN, R, P.; GRAHAM, J, K. Spermatozoal function. In: LEA & FEBIGER (Ed.). **Equine reproduction**. Philadelphia: [s.n.]. p. 1137.
- ANDERSEN, A. H. et al. Effect of reduced glutathione (GSH) supplementation to Tris-egg yolk extender on chilled semen variables of dogs. **Animal Reproduction Science**, n. September, p. 0–1, 2018.
- ANDRADE, E. R. et al. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 2, p. 79–85, 2010.
- ANGRIMANI, D. S. R. et al. Sperm maturation in dogs: sperm profile and enzymatic antioxidant status in ejaculated and epididymal spermatozoa. **Andrologia**, v. 46, n. 7, p. 814–819, 2014.
- ANGRIMANI, D. S. R. et al. The use of reduced glutathione (GSH) as antioxidant for cryopreserved sperm in dogs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, n. 2, p. 419–428, 2018.
- ARRUDA, R. P. DE et al. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. **1 Simpósio Internacional De Reprodução Animal Aplicada**, p. 166–179, 2005.
- BAKER, H, W, G. et al. Protective effect of antioxidants on the impairment of sperm motility by activated polymorphonuclear leukocytes. **Fertility and Sterility**, v. 65, n. 2, p. 411–419, 1996.
- BECCAGLIA, M. et al. Tris-lecithin extender supplemented with antioxidant catalase for chilling of canine semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. SUPPL. 2, p. 345–349, 2009.
- BECONI, M. T. et al. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. **Theriogenology**, v. 40, n. 4, p. 841–851, 1993.
- BENDICH, A. Antioxidant Micronutrients and Immune Responses. **The New York Academy of Sciences - Annals**, v. 587, n. 1, p. 168–180, 1990.

- BILODEAU, J. F. et al. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: Protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. **Theriogenology**, v. 57, n. 3, p. 1105–1122, 2002.
- BJORNEBOE, A.; BJORNEBOE, G.-E.; DREVON, C. A. Absorption , Transport and Distribution of Vitamin E. **The Journal of Nutrition**, v. 120, n. March 1989, p. 233–242, 1990.
- BLATT, D. H.; LEONARD, S. W.; TRABER, M. G. Vitamin E kinetics and the function of tocopherol regulatory proteins. **Nutrition**, v. 17, n. 10, p. 799–805, 2001.
- BONNES-TAOUREL, D.; GUÉRIN, M. C.; TORREILLES, J. Is malonaldehyde a valuable indicator of lipid peroxidation? **Biochemical Pharmacology**, v. 44, n. 5, p. 985–988, 1992.
- BRADFORD, A. et al. The effect of vitamin E on the structure of membrane lipid assemblies. **Journal of Lipid Research**, v. 44, n. 10, p. 1940–1945, 2003.
- BREININGER, E. et al. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. **Theriogenology**, v. 63, n. 8, p. 2126–2135, 2005.
- BUNYAGA, A. S. et al. Cryopreservation of dog semen as an alternative method to improved fertility in bitches: A review article. **Manakin**, p. 216–227, 2018.
- BURTON, G. W. et al. Autoxidation of Biological Molecules. 4. Maximizing the Antioxidant Activity of Phenols. **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, n. 24, p. 7053–7065, 1985.
- CHATTERJEE, S.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: Protection by oxidized glutathione. **Molecular Reproduction and Development**, v. 60, n. 4, p. 498–506, 2001.
- CHOW, C. K. Vitamin E and oxidative stress. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 11, p. 215–232, 1991.
- DAD, S. et al. Formation of singlet oxygen from solutions of vitamin E. **Free Radical Research**, v. 40, n. 3, p. 333–338, 2006.
- DE CASTRO, L. S. et al. Sperm oxidative stress is detrimental to embryo development: A dose-dependent study model and a new and more sensitive oxidative status evaluation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.
- DOWLING, D. K.; SIMMONS, L. W. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. Proceedings of the Royal Society B: **Biological Sciences**, v. 276, n. 1663, p. 1737–1745, 2009.
- ENGLAND, G. C. W.; VERSTEGEN, J. P. Radiographic contrast médium for uterine insemination in the bitch, and its effect upon the quality and fertility of fresh dog semen. **Theriogenology**, v. 46, p. 1233–1241, 1996.
- ESPINOSA-CERVANTES, R.; CÓRDOVA-IZQUIERDO, A. Efecto del estrés calórico y el estrés oxidativo en la función espermática de los mamíferos. **Revista Complutense de Ciencias Veterinarias**, v. 12, n. 1, p. 27–39, 2018.

- EVENSON, D.; JOST, L. Sperm Chromatin Structure Assay for Fertility Assessment. **Methods in Cell Science**, v. 22, p. 169–189, 2000.
- FARISS, M. W. Cadmium toxicity: unique cytoprotective properties of alpha tocopheryl succinate in hepatocytes. **Toxicology**, v. 69, n. 1, p. 63–77, 1991.
- FARSTAD, W. Cryopreservation of canine semen - New challenges. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. SUPPL. 2, p. 336–341, 2009.
- FOOTE, R. H. Catalase content of rabbit, ram, bull and boar semen. **Journal of Animal Science**, v. 21, n. 4, p. 966–968, 1962.
- GADEA, J. et al. Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. **Cryobiology**, v. 62, n. 1, p. 40–46, 2011.
- GARNER, D.; HAFEZ, E. Espermatozoides e plasma seminal. In: MANOLE (Ed.). **Reprodução Animal**. 7. ed. São Paulo: [s.n.]. p. 97–110.
- GARRIDO, N. et al. Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. **Asian Journal of Andrology**, v. 6, n. 1, p. 59–65, 2004.
- GATÉ, L. et al. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 53, n. 4, p. 169–180, 1999.
- GRANDJEAN, D.; VAISSAIRE, J. J. **Enciclopédia do cão Royal Canin**. 1^a ed. Paris: Aniwa, 2001.
- GRIVEAU, J. F. et al. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. **Reproduction**, v. 103, n. 1, p. 17–26, 1995.
- GRIVEAU, J. F.; LANNOU, D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. **International Journal of Andrology**, v. 20, n. 2, p. 61–69, 1997.
- GRIVEAU, J. F.; LE LANNOU, D. Effects of antioxidants on human sperm preparation techniques. **International Journal of Andrology**, v. 17, n. 5, p. 225–231, 1994.
- HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. **The American Journal of Medicine**, v. 91, n. 3 SUPPL. 3, 1991.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Pergamon: [s.n.].
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Press, Clarendon: [s.n.].
- HATAMOTO, L. K. et al. Effects of dexamethasone treatment (to mimic stress) and Vitamin E oral supplementation on the spermiogram and on seminal plasma spontaneous lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in dogs. **Theriogenology**, v. 66, n. 6–7, p. 1610–1614, 2006.

- HOLLAND, M. K.; ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Production of superoxide and activity of superoxide dismutase in rabbit epididymal spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 27, n. 5, p. 1109–1118, 1982.
- 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 of Andrology**, v. 10, n. 1987, p. 809–828, 1987.
- JANG, G.; KIM, M. K.; LEE, B. C. Current status and applications of somatic cell nuclear transfer in dogs. **Theriogenology**, v. 74, n. 8, p. 1311–1320, 2010.
- JORDÃO JÚNIOR, A. A. et al. Peroxidação lipídica e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 31, n. 3, p. 434–449, 1998.
- KAKA, A. et al. Effect of Docosahexaenoic acid on Frozen-thawed Quality of Bull Semen in BioXcell® Extender. **Reproduction, Fertility and Development**, n. November, p. A-F, 2015.
- KAKA, A. et al. Effect of in-vitro supplementation of polyunsaturated fatty acids on frozen-thawed bull sperm characteristics using. **Pure and Applied Biology**, v. 5, n. 3, p. 399–405, 2016.
- KAWAI, G. K. V. **Efeito da carnosina na prevenção de crioinjúrias no sêmen de garanhões bons e maus congeladores**. p. 89, 2017.
- KAWAKAMI, E. et al. Superoxide dismutase and catalase activities in the seminal plasma of normozoospermic and asthenozoospermic Beagles. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 69, n. 2, p. 133–6, 2007.
- KIRCHHOFF, C. The dog as a model to study human epididymal function at a molecular level. **Molecular Human Reproduction**, v. 8, n. 8, p. 695–701, 2002.
- LAMIRANDE, E. DE; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa: I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. **Journal of Andrology**, v. 13, n. 5, p. 368–378, 1992.
- LAMIRANDE, E. et al. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v. 72, p. 48–54, 1997.
- LECEWICZ, M. et al. Effect of extender supplementation with low-molecular-weight antioxidants on selected quality parameters of cryopreserved canine spermatozoa. **Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 2, p. 221–227, 2018a.
- LECEWICZ, M. et al. Effect of extender supplementation with low-molecular-weight antioxidants on selected quality parameters of cryopreserved canine spermatozoa. **Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 2, p. 221–227, 2018b.
- LENZI, A. et al. Lipoperoxidation Damage of Spermatozoa Polyunsaturated. **Frontiers in Bioscience**, v5, p. 1–15, 2000.

- LONE, S. A. et al. Study on correlation of sperm quality parameters with antioxidant and oxidant status of buffalo bull semen during various stages of cryopreservation. **Andrologia**, v. 50, n. 4, p. 1–8, 2018.
- LOOMIS, P. R.; GRAHAM, J. K. Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. **Animal Reproduction Science**, v. 105, n. 1–2, p. 119–128, 2008.
- LOPES, B. DE S. **Efeito da adição e/ou suplementação de antioxidante no processo de congelamento/descongelamento de sêmen de cães férteis e subférteis**. [s.l.] Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu. p. 102, 2010.
- LOSANO, J. D. A. et al. The addition of docosahexaenoic acid (DHA) and antioxidants (glutathione peroxidase and superoxide dismutase) in extenders to epididymal sperm cryopreservation in bulls. **Zygote**, v. 26, n. 3, p. 199–206, 2018.
- LOSANO, J. D. A. et al. Utilisation of sperm-binding assay combined with computer-assisted sperm analysis to evaluate frozen-thawed bull semen. **Andrologia**, v. 47, n. 1, p. 77–84, 2015.
- LOSANO, J. D. A. et al. Effect of Vitamin E and Polyunsaturated Fatty Acids on Cryopreserved Sperm Quality in Bos taurus Bulls Under Testicular Heat Stress. **Animal Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 100–109, 2018.
- LUCIO, C. F. et al. Oxidative stress at different stages of two-step semen cryopreservation procedures in dogs. **Theriogenology**, v. 85, n. 9, p. 1568–1575, 2016a.
- LUCIO, C. F. et al. Effect of reduced glutathione (GSH) in canine sperm cryopreservation: In vitro and in vivo evaluation. **Cryobiology**, v. 72, n. 2, p. 135–140, 2016b.
- LUCIO, C. F. et al. Oxidative stress at different stages of two-step semen cryopreservation procedures in dogs. **Theriogenology**, v. 85, n. 9, p. 1568–1575, 2016c.
- LUCIO, C. F. et al. Lipid composition of the canine sperm plasma membrane as markers of sperm motility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, p. 208–213, 2017.
- LÚCIO, C. F. **Efeito da glutatona reduzida (GSH) na criopreservação de espermatozoides da espécie canina: avaliação in vitro e in vivo**. [s.l.] Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, p. 115, 2012.
- LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164–175, 2014.
- MAIA, M. DA S. et al. Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. **Small Ruminant Research**, v. 85, n. 2–3, p. 85–90, 2009.
- MANDAL, R.; BADIYAKAR, D.; CHAKRABARTY, J. Role of Membrane Lipid Fatty Acids in Sperm Cryopreservation. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 2014, n. ID 190542, 2014.
- MATÉS, J. M. Erratum to ‘Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology’. **Toxicology**, v. 163, n. 2–3, p. 219, 2001.

- MATÉS, J. M.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F. M. Role of Reactive Oxygen Species in Apoptosis: Implications for Cancer Therapy. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 32, n. 2, p. 157–170, 2000.
- MICHAEL, A. et al. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 68, n. 2, p. 204–212, 2007.
- MONTEIRO, J. C. et al. Influence of ascorbic acid and glutathione antioxidants on frozen-thawed canine semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. SUPPL. 2, p. 359–362, 2009.
- MONTJEAN, D. et al. Malonaldehyde formation and DNA fragmentation: Two independent sperm decays linked to reactive oxygen species. **Zygote**, v. 18, n. 3, p. 265–268, 2010.
- NEAGU, V. R. et al. Freezing dog semen in presence of the antioxidant butylated hydroxytoluene improves postthaw sperm membrane integrity. **Theriogenology**, v. 73, n. 5, p. 645–650, 2010.
- NICHI, M. et al. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 °C. **Theriogenology**, v. 67, n. 2, p. 334–340, 2007.
- NICHI, M. **Efeito do tratamento com antioxidantes e ácidos graxos poli-insaturados em amostras espermáticas epididimárias de touros**. [s.l.] Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, p. 120, 2009.
- NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system1 1This review is based on the licentiate thesis “Thioredoxin reductase—interactions with the redox active compounds 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and lipoic acid” by Jonas Nordberg. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287–1312, 2001.
- O’FLAHERTY, C.; BECONI, M.; BEORLEGUI, N. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. **Andrologia**, v. 29, n. 5, p. 269–275, 1997.
- OPUWARI, C. S.; HENKEL, R. R. An Update on Oxidative Damage to Spermatozoa and Oocytes. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.
- PARKS, J. E.; LYNCH, D. V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, v. 29, n. 2, p. 255–266, 1992.
- PEÑA, F. J. et al. 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, n. 1–2, p. 85–98, 2003.
- PRETE, C. DEL et al. Effect of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase supplementation in the extender on chilled semen of fertile and hypofertile dogs. v. 19, n. 5, p. 667–675, 2018.
- ROCHA, C. C. et al. Carnosine as malondialdehyde scavenger in stallion seminal plasma and its role in sperm function and oxidative status. **Theriogenology**, v. 119, p. 10–17, 2018.

ROOKE, J. A.; SHAO, C. C.; SPEAKE, B. K. Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and in vitro characteristics of semen. **Reproduction**, v. 121, n. 2, p. 315–322, 2001.

SEAGER, S, W, J. **Artificial insemination in dogs**. Philadelphia: [s.n.].

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, n. 2, p. 213–219, 1993.

SILVA, E, C, B.; GUERRA, M, M, P. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio: produção e efeitos sobre a integridade estrutural e funcional dos espermatozoides. **Ciência Veterinária nos Trópicos, Recife-PE**, v. 13, n. 1/2/3, p. 9–16, 2010.

SILVA, A. R. Atualidades sobre a criopreservação do sêmen de cães. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 1, p. 119–127, 2007.

SILVA, A. R.; CARDOSO, RITA DE CÁSSIA SOARES; SILVA, LÚCIA DANIEL MACHADO DA. Canine Semen ' S Freeze With Different Concentrations of Egg Yolk and Glycerol in Tris and Coconut Water Extenders. **Ciência Rural**, v. 30, n. 6, p. 1021–1025, 2000.

SILVA, R. O. C. DA. **Efeito da adição de antioxidantes enzimáticos na criopreservação do sêmen caprino**. p 83, 2011.

SOBRINHO, C. D. A. B. **Efeito do tratamento com antioxidantes na qualidade de espermatozóides criopreservados de cães**. p. 99, 2009.

SOUZA, J, A, T. **Estudo de algumas características do sêmen de cães da raça pastor alemão**. [s.l.] São Paulo, 1985.

SOUZA, L, S.; MORAIS, E, A.; TONIOLLI, R. Antioxidantes e crioprotetores na criopreservação do sêmen de ovinos. **Nutritime Revista Eletrônica**, v. 15, n. 1, p. 8051–8064, 2018.

SRTZEZEK, R. et al. Characteristics of antioxidant system in dog semen. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 12, n. 1, p. 55–60, 2009.

STRZEZEK, R.; KOZIOROWSKA-GILUN, M.; STAWISZYŃSKA, M. Cryopreservation of canine semen: The effect of two extender variants on the quality and antioxidant properties of spermatozoa. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 15, n. 4, p. 721–726, 2012.

SUÁREZ-MAHECHA, H. et al. Importância de ácidos graxos poliinsaturados presentes em peixes de cultivo e de ambiente natural para a nutrição humana. **Boletim do Instituto de Pesca, São Paulo**, v.28, n. 1, p. 101-110, 2002.

THOMASSEN, R.; FARSTAD, W. Artificial insemination in canids: A useful tool in breeding and conservation. **Theriogenology**, v. 71, n. 1, p. 190–199, 2009.

THURSTON, L. M. et al. Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 3, p. 382–394, 2001.

TUFARELLI, V. et al. Effects of the supplementation with an high-polyphenols extra-virgin olive oil on kinetic sperm features and seminal plasma oxidative status in healthy dogs. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, n. 3, p. 582–587, 2018.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149–179, 2002.

VIEIRA, N. DE M. G. et al. Induced sperm oxidative stress in dogs: Susceptibility against different reactive oxygen species and protective role of seminal plasma. **Theriogenology**, v. 108, p. 39–45, 2018.

WAKAMATSU, T. H. et al. Evaluation of lipid oxidative stress status in Sjögren syndrome patients. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 54, n. 1, p. 201–210, 2013.

WANG, A. W. et al. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. **Urology**, v. 49, n. 6, p. 921–925, 1997.

WATSON, P, F. The effects of cold shock on sperm cell membranes. In: PRESS, A. (Ed.). **The Effects of Low Temperatures on Biological Membranes**. London: [s.n.]. p. 189–218.