

**CRISTINA DE FÁTIMA LÚCIO**

**Efeito da glutathiona reduzida (GSH) na  
criopreservação de espermatozóides da espécie  
canina: avaliação *in vitro* e *in vivo***



**São Paulo  
2012**

**CRISTINA DE FÁTIMA LÚCIO**

**Efeito da glutathiona reduzida (GSH) na  
criopreservação de espermatozóides da  
espécie canina: avaliação *in vitro* e *in vivo***

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 Doutor em Ciências

**Departamento:**  
Reprodução animal

**Área de concentração:**  
Reprodução Animal

**Orientador:**  
Profa. Dra. Camila Infantosi Vannucchi

São Paulo

2012

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

#### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2578  
FMVZ

Lúcio, Cristina de Fátima

Efeito da glutatona reduzida (GSH) na criopreservação de espermatozoides da espécie canina: avaliação *in vitro* e *in vivo* / Cristina de Fátima Lúcio. -- 2012.  
115 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.  
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Profa. Dra. Camila Infantsi Vannucchi.

1. Criopreservação seminal. 2. Glutatona reduzida. 3. Inseminação artificial.  
4. Endoscopia transcervical. I. Título.



## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeito da glutathione reduzida na criopreservação de espermatozóides da espécie canina: avaliação *in vitro* e *in vivo*", utilizando 05 (cinco) cães, protocolado sob o nº1727/2009, sob a responsabilidade da Profa Dra Camila Infantosi Vannucchi, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 19/08/09.

We certify that the Research "Influence of glutathione antioxidant on frozen thawed canine semen: *in vitro* and *in vivo* analysis", utilizing 05 (five) dogs, protocol number 1727/2009, under the responsibility Profa Dra Camila Infantosi Vannucchi, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 08/19/09.

São Paulo, 20 de agosto de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni  
Presidente da Comissão de Bioética da FMVz/USP

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: LÚCIO, Cristina de Fátima

Título: Efeito da glutathiona reduzida (GSH) na criopreservação de espermatozóides da espécie canina: avaliação *in vitro* e *in vivo*

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 Doutor em Ciências

**Data:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Prof.Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

**Aos meus pais, Ivone e Demerval,  
pelo apoio, paciência e amor  
incondicional.**

## OS MEUS MAIS SINCEROS AGRADECIMENTOS...

Aos meus pais, Ivone e Demerval, minha eterna gratidão e mais sincero amor! Foi por vocês acreditarem em mim que alcanço mais um objetivo em minha vida! São minhas referências profissionais e pessoais, meus exemplos de que quando somos corretos e dedicados, os frutos colhidos são sempre os melhores! Obrigada!

Fábio, obrigada por estar ao meu lado e me ajudar sempre que preciso de conselhos de irmão mais novo!

Camila ou Chefe! Sem seu apoio e confiança eu não conseguiria! Você não apenas me orientou, mas me motivou e me mostrou caminhos. Soube ver o que fazia meus olhos brilharem e disse “vá fazer”! Mais uma vez posso dizer que você é um exemplo de profissional e que sinto muito orgulho de fazer parte de sua constelação. Muito obrigada!

Liege Garcia, Fernanda Regazzi, Daniel Angrimani e Gisele Veiga, fazer aquilo que gostamos, por si só é um prazer, mas fazer o que gostamos com pessoas tão especiais é um presente! Obrigada por toda a ajuda não apenas na parte experimental, mas também nos momentos de diversão, nas risadas, por me ouvirem e me aguentarem no bom e no mau humor! Passar este período com vocês foi maravilhoso e espero tê-los sempre em minha vida!

Aos pós graduandos Andressa Dalmazzo, Carolina Rocha, João Diego de Agostini, Roberta Harue, Fernanda Sevciuc e pós-doutorandos Paola Góes, Marcílio Nichi e Camilla Mota pela ajuda durante as análises das amostras. Foi uma correria, mas tudo deu certo graças à ajuda de vcs! Obrigada!

A todos que me ajudaram trazendo os cães para participarem do meu experimento: Fernanda Regazzi, Isabella Calli, José Sérgio, Kathleen Schwab, Liege Garcia, Mariana Giassetti, Melissa Batalha, Nora Jacobs, Paola Góes, Renata Squarzoni e Taty Cavallini.

A todos os animais que participaram deste experimento!

Às amigas Alessandra Nicácio, Lindsay Gimenes e Mariana Groke! Amigas para todas as horas: boas, ruins, mais ou menos! Sempre dispostas a me ouvir e me aconselhar! Quantas risadas, quantas histórias para contar para os netos, porque para os filhos não pode né!!! Amir Klink disse “Quem tem um amigo, mesmo que um só, não importa onde se encontre, jamais sofrerá de solidão; poderá morrer de saudades, mas não estará só”, e vocês são as provas de que isso é a mais pura verdade! Obrigada!

Às queridas Ana Rua, Flávia Pini e Valéria Baraldi! Amigas que me ajudaram a sair um pouco do mundo veterinário. Obrigada por todos os momentos de diversão, pelos conselhos, pela amizade sincera! Vocês tornaram minha vida mais leve e divertida!

À Verinha por cuidar de casa enquanto estou em São Paulo, me sinto muito mais tranquila com você na minha vida e na vida de minha família! Obrigada!

Aos colegas de departamento Adriano Siqueira, Bruna Oliveira, Carina Guimarães, Everton Lopes, Flávia Barros, Giana Saurin, José Sérgio, Júlia Baldrighi, Júlia Soares, Juliana Senhorini, Lilian Dias, Manoel Sá, Mariana Giassetti, Mariana Queiroz, Pedro Risolia, Rafaela Lima, Renata Simões, Robinson Worst, Rodrigo Amaral, Samir Nicolau, Thaís Hamilton pelos momentos de descontração nos almoços e churrascos além das diversas conversas produtivas e culturais!

À professora Valquiria Hyppolito Barnabe por ceder o Laboratório de Andrologia para avaliação seminal pelo aparelho Hamilton Thorne (CASA) e realização da análise do estresse oxidativo (TBARS).

À professora Mayra Elena O. A. Assumpção por disponibilizar o citômetro de fluxo para as análises seminais.

Ao André Villela pela assistência e treinamento com o endoscópio, além de ser um amigo querido! Obrigada!

À PROVET por realizar as dosagens de progesterona.

À Dona Silvia pelo carinho!

Às queridas secretárias Harumi, Roberta e Thaís por toda assistência e paciência!

Aos funcionários Belau, Claudia, Irailton, Luis, Miguel e Priscila por toda disposição em ajudar!

Aos funcionários da biblioteca Virginie Buff D'Ápice e em especial à Elza Faquim.

Ao Departamento de Reprodução Animal, onde se produz ciência, profissionais, amizades, histórias, onde existem diferenças que se completam, onde a luz de cada um faz com que este seja um lugar iluminado!

À FAPESP pelo auxílio pesquisa (processo FAPESP 2009/52760-3).

À CAPES pela bolsa de doutorado.

E a Deus sempre!



**“Façamos da interrupção um caminho novo. Da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sonho uma ponte, da procura um encontro.”**

*Fernando Sabino*

## RESUMO

LÚCIO, C. F. Efeito da glutathiona reduzida (GSH) na criopreservação de espermatozoides da espécie canina: avaliação *in vitro* e *in vivo*. [Effect of reduced glutathione (GSH) in the cryopreservation of canine spermatozoa: *in vitro* and *in vivo* evaluation]. 2012. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O presente experimento teve por objetivos comparar a adição de diferentes concentrações de glutathiona reduzida (GSH) no diluidor para criopreservação do sêmen de cães, considerando-se as características morfofuncionais pós-descongelamento; e verificar os índices de gestação e número de filhotes por ninhada obtidos a partir da inseminação artificial intra-uterina, por cateterização cervical endoscópica, com sêmen criopreservado contendo diferentes concentrações de glutathiona. Na primeira fase do experimento, foram realizadas duas colheitas seminais de 11 reprodutores com intervalo mínimo de uma semana entre os procedimentos. Foram empregadas três concentrações diferentes de glutathiona reduzida (0, 10 e 20 mM) ao meio de congelamento tris-gema-citrato. O sêmen fresco, refrigerado, glicerolizado e descongelado foram avaliados por citometria de fluxo com uso de sondas específicas para determinar a integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e fragmentação de DNA. Também foi realizada dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) para avaliar os níveis de estresse oxidativo. Na segunda fase do experimento, foram inseminadas 6 fêmeas, alocadas em dois grupos: inseminação intra-uterina com sêmen congelado em diluidor contendo 10 mM (IA-GSH10, n=3) e sem a adição de glutathiona (IA-GSH0, n=3). O acompanhamento do ciclo estral foi realizado por citologia vaginal, vaginoscopia, dosagem de progesterona e LH. Foram realizadas duas inseminações no 5<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> dias após pico de LH e a gestação diagnosticada aos 30 dias. A adição de 10 e 20 mM de GSH ao diluidor para criopreservação promoveu queda na motilidade espermática nas amostras descongeladas, sendo o maior prejuízo observado na concentração de 20 mM. Foi detectada maior porcentagem de acrossomos íntegros nos grupos tratados. A

glicerolização e, principalmente, a exposição do espermatozóide ao nitrogênio líquido e posterior descongelamento foram responsáveis pela diminuição da motilidade espermática, em consequência ao prejuízo da função mitocondrial promovida pela produção de radicais livres durante o processamento seminal. A gestação foi diagnosticada em duas fêmeas do grupo IA-GSH10 e duas do grupo IA-GSH0. Em conclusão, a adição de 10 e 20 mM de GSH ao diluidor para criopreservação seminal não promoveu os efeitos protetores esperados na espécie canina, sendo a concentração de 20 mM responsável por maiores prejuízos à amostra seminal. A adição de 10 mM de GSH ao diluidor para criopreservação seminal na espécie canina manteve o índice de fertilidade semelhante ao obtido com sêmen criopreservado sem a suplementação antioxidante.

## ABSTRACT

LÚCIO, C. F. Effect of reduced glutathione (GSH) in the cryopreservation of canine spermatozoa: *in vitro* and *in vivo* evaluation [Efeito da glutathiona reduzida (GSH) na criopreservação de espermatozóides da espécie canina: avaliação *in vitro* e *in vivo*.] 2012. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The present experiment aimed to compare the addition of different concentrations of reduced glutathione (GSH) on frozen-thawed canine semen, considering the morphofunctional characteristics; and to verify the pregnancy rate and number of puppies per litter obtained from intrauterine insemination by endoscopic catheterization of the cervix, with frozen-thawed semen containing different concentrations of glutathione. During the first phase of the experiment, two seminal samples collected weekly from 11 mature dogs were used. Three different concentrations of reduced glutathione (0, 10 and 20 mM) were supplemented in a tris-citrate egg yolk extender. The fresh, chilled, glycerolized and post-thawed semen were assessed by flow cytometry using specific probes to determine plasma membrane and acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and DNA fragmentation. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay was also performed to assess the occurrence of oxidative stress. In the second phase of the experiment, six canine females were allocated into two groups: intrauterine insemination with frozen-thawed semen containing 10 mM GSH (IA-GSH10, n = 3) and without the addition of glutathione (IA-GSH0, n = 3). Bitches were monitored by vaginal cytology, vaginoscopy, progesterone and LH assays. Two inseminations were performed on days 5 and 6 post LH peak. We verified that the addition of 10 and 20 mM of GSH to semen extender promoted a decrease in post-thaw sperm motility, as well as a higher damage degree at the 20 mM concentration. We also detected a higher percentage of acrossomal integrity in treated groups. At glycerolization and moreover, the sperm exposure to liquid nitrogen and further thawing, were responsible for the decrease in sperm motility, due to the loss of mitochondrial function through the free radicals production. Gestation was diagnosed

in two female from IA-GSH10 group and two bitches of the IA-GSH0 group. In conclusion, we did not observe the expected protective effects of the addition of 10 and 20 mM GSH to semen extender. Furthermore, the concentration of 20 mM was responsible for the more extreme damage to semen sample. The supplementation of 10 mM GSH to semen extender for cryopreservation maintained the fertility rates similar to the ones observed for cryopreservation without antioxidant supplementation in dogs.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1– Ilustração da velocidade retilínea (VSL), velocidade média de percurso (VAP) e velocidade curvilínea (VCL).....	42
Quadro 1– Abreviações e significado das variáveis analisadas pelo CASA.....	42
Figura 2 - Seleção da população de espermatozóides pela sonda FITC-PSA (A) e separação das populações marcadas (B) com PI (1), com FITC (2), FITC/PI (3) e sem marcação (4) .....	44
Figura 3– Seleção da população de espermatozóides pela sonda JC1 (A) e separação das populações marcadas (B) com elevado potencial de membrana (1) e baixo potencial de membrana (2).....	45
Figura 4– Seleção da população de espermatozóides pela sonda SCSA (A) e separação das populações marcadas (B) com fragmentação de DNA .....	46
Figura 5– Kit Witness LH (a) teste negativo e (b) teste positivo para o pico de LH.....	49
Figura 6– Inseminação artificial por endoscopia transcervical em cadela.....	49
Figura 7– Atividade mitocondrial por oxidação da 3,3'-diaminobenzidina (DAB) em relação ao tempo (refrigeração, glicerolização e descongelação).....	73
Quadro 2– Dados do acompanhamento do ciclo estral e da inseminação artificial da fêmea 1 .....	85
Figura 8– Resultado da dosagem de LH (Kit Witness LH) da fêmea 1 .....	85
Quadro 3– Dados do acompanhamento do ciclo estral e da inseminação artificial da fêmea 2 .....	86
Figura 9– Resultado da dosagem de LH (Kit Witness LH) da fêmea 2 .....	86
Quadro 4– Dados do acompanhamento do ciclo estral e da inseminação artificial da fêmea 3 .....	87
Figura 10– Resultado da dosagem de LH (Kit Witness LH) da fêmea 3.....	87
Quadro 5– Dados do acompanhamento do ciclo estral e da inseminação artificial da fêmea 4 .....	88
Figura 11– Resultado da dosagem de LH (Kit Witness LH) da fêmea 4.....	88
Quadro 6– Dados do acompanhamento do ciclo estral e da inseminação artificial da fêmea 5 .....	89

Figura 12– Resultado da dosagem de LH (Kit Witness LH) da fêmea 5.....	89
Quadro 7– Dados do acompanhamento do ciclo estral e da inseminação artificial da fêmea 6 .....	90
Figura 13– Resultado da dosagem de LH (Kit Witness LH) da fêmea 6.....	90
Figura 14– Filhotes nascidos de inseminação artificial com sêmen criopreservado por meio de endoscopia transcervical (a), ultrassonografia da fêmea 2 (b) .....	91

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Média e desvio padrão da motilidade subjetiva, vigor e concentração espermática do sêmen fresco - São Paulo - 2012.....	52
Tabela 2– Média e desvio padrão dos defeitos espermáticos maiores, menores e totais analisados por meio das técnicas de Eosina-Nigrosina e Formol Salino no sêmen fresco - São Paulo – 2012.....	53
Tabela 3– Média e desvio padrão das variáveis seminais por análise computadorizada da motilidade (CASA) do sêmen fresco - São Paulo - 2012.....	53
Tabela 4– Média e desvio padrão da porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática íntegra, avaliada pela técnica da Eosina-Nigrosina, e da avaliação por citometria de fluxo das sondas FITC/PI (integridade de membranas) e SCSA (fragmentação de DNA) do sêmen fresco - São Paulo - 2012.....	54
Tabela 5– Média e desvio padrão da avaliação mitocondrial espermática por meio da oxidação da 3,3'-diaminobenzidina (DAB) e da sonda JC1 por citometria de fluxo do sêmen fresco - São Paulo - 2012 .....	54
Tabela 6– Média e desvio padrão da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) espontâneo (ng/mL) e induzido (ng/10 <sup>6</sup> sptz) do sêmen fresco - São Paulo - 2012 .....	54
Tabela 7– Valores de probabilidade (p) para os efeitos principais <i>Momento de Avaliação Seminal</i> (Tempo) e <i>Grupos Experimentais</i> (Tratamento) e sua interação (Tratamento x Tempo) para as distintas variáveis seminais - São Paulo –2012.....	55
Tabela 8– Média e desvio padrão da motilidade espermática subjetiva (%) após refrigeração, glicerolização e pós-descongelção nos grupos GSH0, GSH10 e GSH20 - São Paulo – 2012 .....	56
Tabela 9– Média e desvio padrão da motilidade subjetiva e vigor dos grupos GSH0, GSH10 e GSH20 - São Paulo - 2012.....	56
Tabela 10– Média e desvio padrão das variáveis por análise computadorizada da motilidade (CASA) dos grupos GSH0, GSH10 e GSH20 - São Paulo – 2012.....	57



Tabela 11– Média e desvio padrão da porcentagem de espermatozóides com membrana íntegra avaliada pela técnica da Eosina-Nigrosina e avaliação por citometria de fluxo das sondas FITC/PI (integridade de membranas) e SCSA (fragmentação de DNA) dos grupos GSH0, GSH10 e GSH20 - São Paulo – 2012.....	57
Tabela 12– Média e desvio padrão da atividade mitocondrial por oxidação da 3,3'-diaminobenzidina (DAB) e por avaliação da sonda JC1 em citometria de fluxo dos grupos GSH0, GSH10 e GSH20 - São Paulo – 2012.....	58
Tabela 13– Média e desvio padrão da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) espontâneo e induzido dos grupos GSH0, GSH10 e GSH20 - São Paulo - 2012.....	58
Tabela 14– Coeficientes de correlação e significância das variáveis obtidas na avaliação seminal do grupo GSH0 - São Paulo – 2012.....	59
Tabela 15– Coeficientes de correlação e significância das variáveis obtidas na avaliação seminal do grupo GSH10 - São Paulo – 2012.....	62
Tabela 16– Coeficientes de correlação e significância das variáveis obtidas na avaliação seminal do grupo GSH20 - São Paulo – 2012.....	65
Tabela 17– Média e desvio padrão da motilidade espermática subjetiva e vigor espermático dos grupos GSH0, GSH10 e GSH20 após descongelação - São Paulo – 2012.....	68
Tabela 18– Média e desvio padrão das variáveis da análise computadorizada da motilidade (CASA) dos grupos GSH0, GSH10 e GSH20 após descongelação - São Paulo – 2012.....	69
Tabela 19– Média e desvio padrão da porcentagem de espermatozóides com membrana íntegra avaliada pela técnica da Eosina-Nigrosina e por citometria de fluxo das sondas FITC/PI (integridade de membranas) e SCSA (fragmentação de DNA) dos grupos GSH0, GSH10 e GSH20 após descongelação - São Paulo – 2012.....	69
Tabela 20– Média e desvio padrão da atividade mitocondrial por oxidação da 3,3'-diaminobenzidina (DAB) e por avaliação da sonda JC1 dos grupos GSH0, GSH10 e GSH20 após descongelação - São Paulo – 2012 .....	70
Tabela 21– Média e desvio padrão da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) espontâneo e induzido dos grupos GSH0, GSH10 e GSH20 após descongelação - São Paulo – 2012.....	70

Tabela 22– Média e desvio padrão da motilidade espermática subjetiva e vigor espermático após refrigeração, glicerolização e descongelação - São Paulo – 2012 .....	70
Tabela 23– Média e desvio padrão das variáveis seminais por análise computadorizada da motilidade (CASA) após refrigeração, glicerolização e descongelação - São Paulo – 2012.....	71
Tabela 24– Média e desvio padrão da porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática íntegra analisada pela técnica da Eosina-Nigrosina e por avaliação das sondas FITC/PI (integridade de membranas) e SCSA (fragmentação do DNA) por citometria de fluxo após refrigeração, glicerolização e descongelação. São Paulo – 2012 .....	72
Tabela 25– Média e desvio padrão da atividade mitocondrial por oxidação da 3,3'-diaminobenzidina (DAB) e por avaliação da sonda JC1 após refrigeração, glicerolização e descongelação - São Paulo – 2012.....	72
Tabela 26– Média e desvio padrão da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) espontâneo e induzido após refrigeração, glicerolização e descongelação - São Paulo – 2012.....	73
Tabela 27– Coeficientes de correlação e significância das variáveis obtidas na avaliação seminal das amostras refrigeradas - São Paulo – 2012.....	75
Tabela 28– Coeficientes de correlação e significância das variáveis obtidas na avaliação seminal das amostras glicerolizadas - São Paulo – 2012.....	78
Tabela 29– Coeficientes de correlação e significância das variáveis obtidas na avaliação seminal das amostras descongeladas - São Paulo – 2012.....	81
Tabela 30– Diagnóstico de gestação e número de filhotes das fêmeas inseminadas com sêmen criopreservado - São Paulo – 2012 .....	91

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>24</b>
2.1	CRIOPRESERVAÇÃO SEMINAL.....	24
2.2	ESTRESSE OXIDATIVO E A CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES .....	25
2.3	INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL COM SÊMEN CRIOPRESERVADO .....	29
2.3.2	Acompanhamento do Ciclo Estral .....	31
2.3.3	Momento da Inseminação e Dose Inseminante para Sêmen Criopreservado.....	32
<b>3</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>37</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>39</b>
5.1	ETAPA I – CRIOPRESERVAÇÃO E AVALIAÇÃO SEMINAL.....	39
5.1.1	Animais e Constituição dos Grupos Experimentais .....	39
5.1.2	Diluidor.....	40
5.1.3	Congelação e Descongelamento do Sêmen .....	40
5.1.4	Avaliação do Sêmen Fresco, Pós-Refrigeração, Pós-glicerolização e Pós- Congelamento .....	41
5.1.5	Análise Estatística.....	46
5.2	ETAPA II – INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL COM SÊMEN CRIOPRESERVADO .....	47
5.2.1	Animais e Grupos Experimentais .....	47
5.2.2	Criopreservação Seminal.....	47
5.2.3	Acompanhamento do Ciclo Estral e Momento da Inseminação.....	48
5.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>52</b>
6.1	ETAPA I.....	52
6.1.1	Sêmen Fresco .....	52
6.1.3	Comparação entre os Grupos Experimentais ou Concentração de Glutathione Reduzida (GSH0, GSH10 e GSH20).....	56

6.1.4	Comparação das Variáveis Seminais entre os Grupos Experimentais ou Concentração de Glutathione Reduzida (GSH0, GSH10 e GSH20) nas Amostras Pós-Descongelamento.....	68
6.1.5	Comparação entre as Etapas de Criopreservação Seminal (refrigeração, glicerolização e pós-descongelamento).....	70
6.2	ETAPA II.....	84
6.2.1	Acompanhamento do Ciclo Estral das Fêmeas Inseminadas .....	84
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>93</b>
7.1	EFEITO DO TRATAMENTO ANTIOXIDANTE DA GSH EM DISTINTAS CONCENTRAÇÕES (0MM, 10MM E 20MM) .....	93
7.2	EFEITO DO TRATAMENTO ANTIOXIDANTE DA GSH EM DISTINTAS CONCENTRAÇÕES (0MM, 10MM E 20MM) NAS AMOSTRAS PÓS-DESCONGELAMENTO.....	95
7.3	EFEITO DAS ETAPAS DE CRIOPRESERVAÇÃO SEMINAL (REFRIGERAÇÃO, GLICEROLIZAÇÃO E PÓS-DESCONGELAMENTO).....	96
7.4	TESTE <i>IN VIVO</i> .....	99
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>102</b>
	REFERÊNCIAS .....	104
	ANEXO A .....	114
	ANEXO B.....	115

# *Introdução*



## 1 INTRODUÇÃO

A reprodução de cães alcançou grande importância na atualidade. O elevado valor zootécnico e econômico de alguns indivíduos, somado ao caráter afetivo no âmbito familiar, ampliou a necessidade de gerar descendentes selecionados, além da preservação do material genético para futuras gerações. O crescente avanço das biotécnicas reprodutivas aplicadas aos animais de companhia e de produção, tais como a inseminação artificial, criopreservação de sêmen, fecundação *in vitro* e a clonagem, promove o incremento no desempenho reprodutivo. Entretanto, a evolução dos conhecimentos em reprodução assistida na espécie canina é vagarosa quando comparada aos animais de produção.

Dentre as biotécnicas reprodutivas aplicadas aos cães, a criopreservação de sêmen tem importância primordial, por permitir a preservação e propagação do material genético *post mortem*; possibilitar o transporte do sêmen para localidades distantes, diminuindo, desta maneira, os custos de transporte animal; aumentar a diversidade genética da espécie, além de ser uma biotécnica reprodutiva preconizada para canídeos silvestres, sendo o cão doméstico o modelo biológico.

Apesar de sua reconhecida importância biológica, a criopreservação seminal promove elevada perda de motilidade espermática e diminui a sobrevivência dos espermatozoides após a descongelação. Sabe-se que o processo de criopreservação seminal leva à produção de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* - ROS) pelos espermatozoides. Em pequenas quantidades, as ROS tem efeito fisiológico, pois participam, dentre outras funções, da capacitação espermática. Entretanto, em quantidades elevadas as ROS tornam-se deletérias para a célula espermática (AITKEN, 1997). A grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados na membrana plasmática e a baixa concentração de enzimas protetoras fazem dos espermatozoides células mais suscetíveis ao estresse oxidativo (SHARMA; AGARWAL, 1996). Dentre os prejuízos causados pelo estresse oxidativo, podem ser citados: queda na motilidade espermática, alterações de membrana plasmática e, em último estágio, danos ao DNA dos espermatozoides (GRIVEAU; LE LANNOU, 1997).

Estudos em diversas espécies indicam que a adição de agentes antioxidantes no meio diluidor para criopreservação diminui os efeitos deletérios do estresse oxidativo e, conseqüentemente, melhora a qualidade espermática pós-descongelação (GADEA et al., 2005; GADEA et al., 2007, MONTEIRO et al., 2009). A glutatona reduzida (GSH) é um antioxidante não enzimático e atua reduzindo o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em água

(GADEA et al., 2011). Durante o estresse oxidativo, além das ROS, há produção de  $H_2O_2$ , causador de sérios danos celulares, por sua elevada longevidade e capacidade de atravessar membranas biológicas, bem como ser fonte de radicais livres (NORDBERG; ARNER, 2001, ORTEGA et al., 2003). Estudos anteriores foram realizados com o objetivo de testar a eficácia da glutatona reduzida no diluidor para criopreservação seminal de bovinos e cães, com resultados satisfatórios quando utilizada a concentração de 5 mM em ambas as espécies (GADEA et al., 2004, MONTEIRO et al., 2009). Entretanto, na espécie canina, estudos sistemáticos sobre os efeitos espermáticos diretos de distintas concentrações de GSH são escassos, todavia, necessários para obter-se o melhor desempenho dos protocolos de criopreservação seminal.

*Revisão de Literatura*





## 2 REVISÃO DE LITERATURA

As biotécnicas reprodutivas em cães, quando comparadas a outras espécies, apresentam avanço lento e discreto. A primeira inseminação artificial nessa espécie foi realizada em 1780, entretanto, a primeira ninhada oriunda de inseminação artificial com sêmen criopreservado foi relatada em 1969, aproximadamente dois séculos depois (SEAGER, 1986). Na atualidade, a utilização de sêmen criopreservado na reprodução canina é um desafio, em função da baixa qualidade espermática obtida na descongelação e da dificuldade em realizar a inseminação intra-uterina. Portanto, estudos devem ser realizados para que o avanço da técnica de criopreservação seminal canina alcance a eficiência observada em outras espécies, uma vez que não existe um protocolo padrão ou consensual.

### 2.1 CRIOPRESERVAÇÃO SEMINAL

Nas espécies em que o uso do sêmen criopreservado na inseminação artificial é rotineiro, as falhas atribuídas ao diluidor são rapidamente detectadas e modificadas, o que favorece a homogeneização da técnica (FARSTAD, 2009). Na espécie canina, não existe padronização da fórmula do diluidor, bem como do protocolo de criopreservação seminal. Ainda, os dados de fertilidade com o emprego de sêmen criopreservado são escassos, o que impede a avaliação e uniformização da técnica nesta espécie (FARSTAD, 2009).

Os diluidores para criopreservação seminal são constituídos por: crioprotetor extracelular (leite, gema de ovo), crioprotetor intracelular (glicerol, etileno glicol ou dimetil sulfóxido), agente tamponante (Tris), açúcar (glicose, sacarose, lactose), sais (citrato de sódio, ácido cítrico) e antibiótico (penicilina, estreptomicina). Há vários diluidores preconizados para criopreservação seminal na espécie canina, sendo o tris-gema-citrato mundialmente empregado, pois apresenta não apenas atividade tamponante, como também reduz a metabolização da frutose pela célula espermática, contribuindo para a preservação de sua energia (FARSTAD, 1996). A gema de ovo protege o espermatozóide do choque térmico durante a refrigeração e previne a perda de fosfolipídeos da membrana durante o processo de criopreservação. O crioprotetor mais frequentemente utilizado na espécie canina é o glicerol,

o qual preserva a fertilidade espermática durante a congelação e descongelação, sendo sua concentração final variável entre 2 e 8% devido ao seu potencial efeito tóxico para a célula (FARSTAD, 2009; PEÑA et al., 1998).

Na criopreservação seminal, é necessário submeter o espermatozóide à queda da temperatura, desidratação e congelação. A queda da temperatura durante o processo de criopreservação seminal é chamada de refrigeração ou resfriamento. Em cães, tal etapa ocorre por meio de uma curva lenta (0,5°C por minuto) durante a qual o espermatozóide a 37°C alcança a temperatura de 5°C. Neste período, ocorrem mudanças na camada lipídica da membrana plasmática, com alteração de seu estado funcional (WATSON, 2000). A curva de resfriamento é importante, pois a queda da temperatura leva à alteração da permeabilidade da membrana e da regulação do cálcio celular, influenciando o processo de capacitação espermática e reação acrossomal (BARBAS; MASCARENHAS, 2009).

Na congelação, ocorre a formação de cristais de gelo intracelulares que podem causar lesão na membrana plasmática, portanto, é necessário que o espermatozóide perca parte de seu conteúdo líquido (BARBAS; MASCARENHAS, 2009). A desidratação ocorre durante a fase de glicerolização, momento no qual o crioprotetor penetra a célula espermática substituindo parte da água intracelular (BARBAS; MASCARENHAS, 2009).

O processo de descongelação seminal deve ser criterioso, pois a rápida elevação de temperatura e ativação do metabolismo celular deve ocorrer de maneira gradual, reduzindo assim as chances de lesão espermática (BARBAS; MASCARENHAS, 2009). Na espécie canina, o protocolo de descongelação adotado é a exposição da palheta à temperatura de 37°C durante 30 segundos. (THOMASSEN et al., 2006). As causas das alterações celulares durante o processo de criopreservação são principalmente: a queda na temperatura espermática, estresse osmótico e tóxico por exposição ao crioprotetor e a formação de cristais de gelo intra e extracelulares.

## 2.2 ESTRESSE OXIDATIVO E A CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES

O oxigênio é um elemento essencial para a manutenção das funções do espermatozóide, pois a célula espermática desempenha suas funções em ambiente aeróbio. Contudo, a elevada concentração de oxigênio pode culminar em sérios danos celulares, por

formação de espécies reativas de oxigênio ou radicais livres (ORTEGA et al., 2003). O desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres nos sistemas orgânicos gera um estado pró-oxidante promotor de lesões, podendo culminar com a morte celular. Este tipo de lesão é definido como estresse oxidativo (ROVER JÚNIOR et al., 2001).

A formação das ROS ocorre por redução do  $O_2$  ao receber quatro elétrons, com consequente formação de  $H_2O$ . Nesta reação, os produtos intermediários formados são: ânion superóxido ( $O_2^-$ ), hidroperoxila ( $HO_2^-$ ) e hidroxila ( $OH^-$ ) (NORDBERG; ARNER, 2001). Além de tais substâncias, há formação do peróxido do hidrogênio ( $H_2O_2$ ), causador de sérios danos celulares, pois possui elevada longevidade, capacidade de atravessar membranas biológicas e originar radicais livres (NORDBERG; ARNER, 2001).

As ROS são produzidas pelos espermatozóides em condições fisiológicas e desempenham papel importante na função espermática de mamíferos (SALEH; AGARWAL, 2002; BENNETTS; AITKEN, 2005). Em pequena concentração, as espécies reativas de oxigênio são necessárias para que os espermatozóides adquiram a capacidade fecundante, por estarem envolvidas com a função cinética, bem como no processo de capacitação, hiperativação espermática e fusão do oócito com o espermatozóide (AITKEN; FISHER, 1994; SALEH; AGARWAL, 2002). O controle da concentração de radicais livres é realizado pelos antioxidantes presentes no plasma seminal e na célula espermática.

O sêmen possui antioxidantes do tipo enzimáticos (ex: superóxido dismutase - SOD, catalase e glutathiona peroxidase - GPx) e não enzimáticos (ex: glutathiona reduzida - GSH, vitamina E, ascorbato) (GRIVEAU et al., 1995; MICHAEL et al., 2008). A contribuição de cada sistema antioxidante é distinta entre as espécies; entretanto, acredita-se que haja ação sinérgica entre eles (MICHAEL et al., 2008). De acordo com Ferreira e Matsubara (1997), os antioxidantes podem agir inativando os radicais livres (ex: GSH, SOD, catalase, GPx e vitamina E) ou reparando lesões do estresse oxidativo (ex: ácido ascórbico, glutathiona redutase - GR e GPx).

A produção de radicais livres em excesso é responsável por alterações na qualidade seminal, por causar queda na motilidade espermática, além do dano proteico e ao DNA, levando à apoptose celular (GRIVEAU; LE LANNOU, 1997). Os espermatozóides são particularmente sensíveis ao estresse oxidativo, pois sua membrana plasmática contém grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados e o citoplasma, baixa concentração de enzimas protetoras (SHARMA; AGARWAL, 1996). Os ácidos graxos poli-insaturados são suscetíveis à ação dos radicais livres por apresentarem ligações duplas entre carbono, local de uma

cascata de reações chamada de peroxidação lipídica. Trata-se de uma reação que se auto propaga devido à formação dos radicais alquila e peroxila, os quais atuam em outros lipídeos de membrana, até a completa extensão da lesão peroxidativa (SALEH; AGARWAL, 2002; TVRDA et al., 2011). Além disto, as enzimas antioxidantes intracelulares não protegem as membranas acrossomal e plasmática, sendo estas últimas protegidas apenas pelo plasma seminal (IWASAKI; GAGNON 1992; ZINI; DE LAMIRANDE; GAGNON, 1993).

O processo de criopreservação induz à formação de radicais livres em amostras seminais (WATSON, 2000). O choque térmico, a exposição ao oxigênio atmosférico e a remoção do plasma seminal, favorecem a peroxidação lipídica por maior produção de espécies reativas de oxigênio durante o procedimento (BUCAK et al., 2008). A concentração fisiológica de antioxidante no citoplasma espermático é insuficiente para proteger os espermatozóides no processo de criopreservação (BANSAL; BILASPURI, 2011). Como consequência da peroxidação lipídica, é observada destruição da estrutura da matriz lipídica, levando à perda da integridade de membrana, queda na motilidade espermática, lesão do DNA espermático e redução da capacidade fecundante do espermatozóide (AITKEN, 1984; ALVAREZ; STOREY, 1989; AITKEN; BUCKINGHAM; HARKISS, 1993; BUCAK et al., 2010). A compactação do DNA confere certa proteção à ação dos radicais livres, entretanto, Bennetts e Aitken (2005) verificaram que o DNA mitocondrial é geralmente mais vulnerável a lesões oxidativas que o DNA nuclear (AITKEN; BAKER; SAWYER, 2003).

A glutathiona está presente na maioria das células, na forma reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG). A GSH é utilizada pela enzima glutathiona peroxidase (GPx) para reduzir o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em água, formando a GSSH. Posteriormente, a GSSH é reduzida a GSH pela glutathiona redutase, utilizando NADPH como co-fator (GADEA et al., 2011). A glutathiona tem como funções celulares o transporte de aminoácidos, a síntese proteica, a redução da cadeia dissulfeto e a proteção contra o estresse oxidativo. Sua ação antioxidante ocorre de maneira detoxificante, impedindo a lesão celular pelos radicais livres (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; VALENÇA; GUERRA, 2007). A GPx está presente no núcleo da célula espermática e também no fluido epididimário (DREVET, 2006), sugerindo um mecanismo de proteção intracelular contra a produção de ROS.

Para minimizar os efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio sobre os espermatozóides durante a criopreservação, as atuais pesquisas envolvem a adição de agentes antioxidantes ao diluidor, tais como glutathiona (GSH), ácido ascórbico e catalase. A suplementação de antioxidantes ao diluidor para criopreservação permite melhorar a

qualidade espermática após a descongelação, além de aumentar a longevidade dos espermatozoides, fator crucial para a criopreservação do espermatozoide canino (MONTEIRO et al., 2009). Em diversos trabalhos, distintos antioxidantes foram estudados. Entretanto, não há consenso quanto à substância que proporciona melhores resultados após a descongelação. O emprego da glutathione como antioxidante para congelamento de sêmen apresentou bons resultados pós-descongelamento em experimentos anteriores nas espécies suína e canina (GADEA et al., 2004; MONTEIRO et al., 2009; GADEA et al., 2011).

Stradaoli et al. (2007) demonstraram que a utilização de diluidores comerciais com altos níveis de glutathione proporciona maior motilidade espermática e menor índice de reação acrossomal do sêmen bovino após a criopreservação. Gadea et al. (2007) verificaram que a adição de GSH ao meio de descongelamento melhorou a função espermática e a capacidade de fecundação, por proporcionar maior número de espermatozoides não capacitados e viáveis, menor concentração de ROS e fragmentação de DNA, além de aumentar a capacidade fecundante do espermatozoide *in vitro*. Ainda, os referidos autores observaram menor condensação da cromatina, pois a adição de GSH impediu a ação de radicais livres envolvidos na compactação da cromatina.

Em suínos, a criopreservação de sêmen promove a diminuição da concentração de glutathione pós-descongelamento (GADEA et al., 2004). Verificou-se que a adição de glutathione ao diluidor para criopreservação não altera os parâmetros seminais ou a habilidade de fecundação dos espermatozoides. Entretanto, a adição de 5 mM de GSH ao meio de descongelamento para o sêmen suíno promoveu significativa proteção dos espermatozoides contra o estresse oxidativo (GADEA et al., 2005). A suplementação com GSH pós-descongelamento reduziu o índice de espermatozoides capacitados precocemente e de condensação da cromatina espermática, além de aumentar a taxa de penetração oocitária *in vitro*, promovendo a melhora na função e na capacidade de fecundação dos espermatozoides suínos submetidos à criopreservação (GADEA et al., 2005).

Gadea et al. (2011) detectaram queda na concentração de GSH no sêmen de homens após a criopreservação, seguido da diminuição da funcionalidade espermática. Neste estudo, os autores adicionaram 1 mM de GSH ao meio de criopreservação e verificaram melhora na motilidade e na viabilidade espermática, além de significativa diminuição nos níveis de ROS.

Segundo Kawakami et al. (2007), cães astenospérmicos apresentam baixa concentração dos antioxidantes SOD e catalase no plasma seminal. A redução da motilidade espermática é atribuída às alterações na membrana plasmática promovidas pela maior

quantidade de ROS (KAWAKAMI et al., 2007). Michael et al. (2007) testaram diversos antioxidantes (vitamina C, taurina, catalase, N-acetyl L-cisteína, vitamina E e B16) na criopreservação do sêmen canino e determinaram a concentração do anion superóxido, radical hidroxil e espécie reativa de oxigênio total (ROS). Dentre os antioxidantes empregados, a catalase proporcionou melhor qualidade espermática pós-descongelamento. No sêmen canino criopreservado, Monteiro et al. (2009) observaram que a glutathione (GSH) possui melhor ação protetora sobre algumas características seminais, em comparação ao ácido ascórbico, principalmente quando utilizada na concentração de 5 mM. Tal antioxidante promoveu também maior longevidade e viabilidade espermática (MONTEIRO et al., 2009).

Embora o estresse oxidativo e o efeito protetor dos antioxidantes sejam objetos de estudo na atualidade, na espécie canina existem poucos trabalhos demonstrando a efetividade da adição de tais agentes ao meio de congelamento, bem como as consequências da criopreservação do sêmen sobre o estresse oxidativo do espermatozóide.

### 2.3 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL COM SÊMEN CRIOPRESERVADO

A inseminação artificial com sêmen fresco em cadelas apresenta índices de gestação semelhantes aos obtidos no acasalamento natural. Entretanto, o uso do sêmen criopreservado culmina em redução de tais índices (YU et al., 2002). Em outras espécies animais, como a bovina, a utilização do sêmen congelado na inseminação artificial atinge bons resultados, sendo amplamente utilizada (BARBAS; MASCARENHAS, 2009). Já Linde-Forsberg et al. (1993) verificaram que inseminações artificiais realizadas com sêmen criopreservado na espécie canina tem redução de 30% na taxa de gestação e ninhadas 31% menores, quando comparados a inseminações com sêmen fresco. Os espermatozóides criopreservados apresentam menor longevidade, o que compromete o resultado da técnica. O sucesso da inseminação artificial com sêmen criopreservado depende principalmente da técnica de inseminação artificial, do método de detecção da ovulação, do momento da inseminação, do número de inseminações e da concentração espermática (EILTS, 2005).

#### 2.3.1 Técnicas de Inseminação Artificial

O sêmen *in natura* pode ser destinado à inseminação artificial sob duas formas: fresco ou processado (JOHNSTON; KUSTRITZ; OLSON, 2001). Em relação à técnica de inseminação artificial com sêmen congelado, índices satisfatórios de gestação só foram alcançados com o desenvolvimento da técnica de deposição seminal intra-uterina. Entretanto, trata-se de uma técnica de difícil realização na cadela. O comprimento vaginal, a prega dorsal da cérvix, o estreitamento da região paracervical e a angulação ventral da cérvix dificultam sua cateterização (ENGLAND; VERSTEGEN, 1996).

O acesso ao útero para a realização da inseminação artificial na cadela pode ser realizado por diferentes técnicas. A laparotomia permite o acesso ao útero por meio de cirurgia, cuja execução necessita de anestesia geral. Por ser uma técnica invasiva, recomenda-se execução única durante o ciclo estral, tornando relevante o acompanhamento acurado do período ovulatório da cadela (THOMASSEN; FARSTAD, 2009). O acesso uterino também pode ser realizado por laparoscopia, porém, também há necessidade de anestesia geral, além de necessitar de profissional treinado e equipamento apropriado (THOMASSEN; FARSTAD, 2009).

Há técnicas menos invasivas de acesso ao útero, como por exemplo, a cateterização da cérvix com o uso de cateter Norueguês, com auxílio de palpação abdominal. Entretanto, é uma técnica de difícil execução por impossibilidade de visualização da progressão do cateter diante da particular anatomia do trato reprodutivo da cadela (THOMASSEN; FARSTAD, 2009). É recomendada para cadelas de baixo peso e executada por profissional bastante experiente. Outra forma de realizar a cateterização cervical é com o uso da endoscopia. Embora haja necessidade de treinamento profissional e de aparelho específico, tem como vantagem poder ser realizada mais de uma vez durante o ciclo estral em cadelas não anestesiadas, além de ser relativamente fácil, rápida e não invasiva (WILSON, 2001). Cremonesi et al. (2005) obtiveram 71% de gestação e elevada média de filhotes por ninhada (5,5 filhotes) ao realizarem apenas uma inseminação com sêmen congelado por endoscopia via transcervical. Os autores, ainda, relatam que não foram observados efeitos indesejáveis, tais como lesões traumáticas ou infecções uterinas após o emprego da técnica.

Silva et al. (1996), ao compararem a inseminação artificial com sêmen fresco ou criopreservado por via intra-uterina laparoscópica e intra-vaginal, não observaram diferenças significativas na taxa de prenhez quanto ao método de inseminação artificial. Entretanto,

verificaram que houve menor taxa de gestação para o sêmen criopreservado. Os autores atribuem tal resultado à menor longevidade do sêmen processado, além da maior concentração espermática utilizada na inseminação artificial com sêmen fresco. Já Lindforsberg, Holst, Govette (1999) compararam três técnicas de inseminação artificial com sêmen congelado: intra-vaginal, intra-uterina com uso de cateter Norueguês e intra-uterina com uso de endoscópio de fibra óptica. Como conclusão, os autores referem que a inseminação intra-uterina com cateter Norueguês, associada à boa qualidade espermática pós-descongelamento e ao adequado acompanhamento do ciclo estral da cadela, apresenta taxa de prenhez e número de filhotes por ninhada semelhantes aos obtidos no acasalamento natural.

Em estudo retrospectivo, Thomassen et al. (2006) verificaram que a inseminação artificial com sêmen congelado apresenta melhores resultados quando realizada pela técnica intra-uterina, utilizando sêmen com adequada qualidade após a descongelamento e em 2 a 3 dias após a ovulação. Neste estudo, a inseminação foi realizada com cateter rígido após fixação da cérvix por palpação abdominal, sem a necessidade de sedação da cadela. Ainda, os referidos autores sugerem que, ao realizar duas inseminações com intervalo de 24 horas, aumenta-se a acurácia do procedimento.

### 2.3.2 Acompanhamento do Ciclo Estral

O criterioso seguimento do ciclo estral é crucial para o sucesso da reprodução assistida nas cadelas, pois a menor longevidade espermática após a descongelamento determina que a inseminação deva ser realizada imediatamente posterior à maturação oocitária (ROTA et al., 1999). Na cadela, a ovulação dos oócitos primários ocorre entre 48 e 72 horas após o pico de LH e estes tornam-se maduros somente 4 a 6 dias após o pico de LH, quando alcançam o estágio de metáfase II, podendo permanecer viáveis por até 8 dias após a ovulação (JOHNSTON; KUSTRITZ; OLSON, 2001; TSUTSUI et al., 2009). Sabe-se, ainda, que os espermatozoides criopreservados podem manter-se viáveis no trato reprodutivo feminino entre 12 e 24 horas (CONCANNON; BATTISTA, 1989; BADINAND et al., 1993).

O acompanhamento do ciclo estral na cadela pode ser realizado por exame físico, citologia vaginal, vaginoscopia e dosagem de progesterona sérica, com o intuito de detectar indiretamente o pico de LH e, por conseguinte, o dia da ovulação. Durante o proestro, a



cadela apresenta corrimento vaginal sanguíneo, edema vulvar, porém, sem receptividade sexual (JOHNSTON; KUSTRITZ; OLSON, 2001). A citologia vaginal é caracterizada por presença de células superficiais nucleadas em sua maioria, evoluindo para anucleadas com a aproximação do estro. Já a vaginoscopia é caracterizada pela aparência edemaciada da mucosa vaginal, indicando elevada concentração de estradiol, além de níveis de progesterona inferiores a 1 ng/mL.

A aproximação do estro é sugestiva, por meio da vaginoscopia, quando há início do pregueamento secundário da mucosa vaginal, relacionado à diminuição dos níveis estrogênicos, elevação da concentração de progesterona sérica e proximidade do pico de LH (CONCANNON, 2011). Considera-se que a concentração sérica de progesterona correspondente ao pico de LH na cadela esteja entre 1 e 3 ng/mL (CONCANNON, 2011). Durante o estro, a cadela geralmente apresenta receptividade sexual, redução do edema vulvar e diminuição do corrimento vaginal sanguíneo (JOHNSTON; KUSTRITZ; OLSON, 2001). A citologia vaginal apresenta mais de 90% de células superficiais anucleadas e queratinizadas, diminuição do edema vaginal e crescente pregueamento à vaginoscopia e concentração de progesterona entre 4 e 10 ng/mL no momento da ovulação (JOHNSTON; KUSTRITZ; OLSON, 2001; CONCANNON, 2011).

### 2.3.3 Momento da Inseminação e Dose Inseminante para Sêmen Criopreservado

O uso do sêmen criopreservado na inseminação artificial depende de uma série de fatores, tais como: qualidade seminal pré e pós-congelação, número de espermatozoides viáveis após descongelação (dose inseminante), congelabilidade seminal de cada indivíduo e técnica de criopreservação e descongelação do sêmen (ROTA et al., 1999). Entretanto, a inseminação artificial deve ser realizada no momento correto do ciclo estral da cadela e com concentração espermática suficiente para alcançar o resultado esperado. Em diferentes espécies, a perda de fecundidade seminal é compensada por aumento na concentração espermática durante a inseminação artificial (WATSON, 2000).

Utilizando a técnica de deposição intra-uterina do sêmen, auxiliada por um uteroscópio rígido, Rota et al. (1999) realizaram duas inseminações nos dias 3 e 5 após o pico de LH utilizando entre 150 – 200 milhões de espermatozoides totais. Os autores atingiram 100% de

gestações. Já Kim et al. (2007) compararam 3 diferentes concentrações espermáticas (0,5; 5 e 50 milhões de espermatozóides móveis) com inseminação intra-uterina por laparotomia. O momento da ovulação foi estabelecido à progesterona sérica entre 4 e 7 ng/mL, assim, as inseminações foram realizadas três dias após a ovulação. Como resultado, a melhor taxa de gestação foi obtida com o emprego da maior concentração espermática empregada (KIM et al., 2007).

Linde-Forsberg, Holst e Govette (1999) obtiveram 57,9% de gestações com a técnica de inseminação artificial intra-uterina ao utilizarem em média 452 milhões de espermatozóides totais. As inseminações foram realizadas aproximadamente 2 a 5 dias após a ovulação, com a progesterona entre 30 e 75 nmol/mL. Em estudo conduzido por Thomassen et al. (2006), há indicação do uso de 200 milhões de espermatozóides totais para a inseminação intra-uterina, constituindo um volume de 2 a 2,5 mL em inseminações realizadas 2 e 3 pós-ovulação. Já Tsutsui et al. (2000), ao utilizarem dose inseminante entre 100 e 300 milhões de espermatozóides totais em inseminações intra-uterinas por laparotomia, 3 ou 4 dias após a ovulação, obtiveram índice de gestação de 90%.

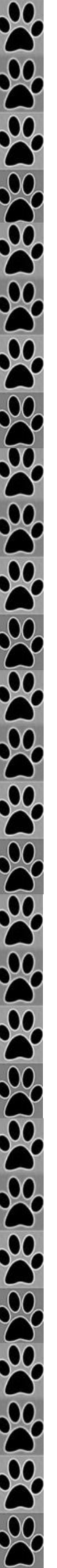
*Hipótese*



**3 HIPÓTESE**

A adição de glutathiona reduzida (GSH) ao meio de criopreservação seminal na espécie canina melhora a qualidade espermática após a descongelação e os índices de gestação na inseminação artificial intra-uterina transcervical com sêmen criopreservado.

## *Objetivos*



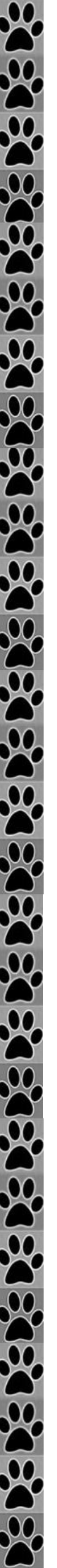
## **4 OBJETIVOS**

Em face do exposto, o objetivo geral deste estudo foi verificar o efeito da adição de antioxidantes no meio para criopreservação de sêmen canino sobre a qualidade e viabilidade espermática pós-descongelamento.

Como objetivos específicos, destaca-se:

- Comparar diferentes concentrações de glutatona reduzida (0, 10 e 20 mM) no diluidor para criopreservação do sêmen de cães, tendo como variáveis as características morfofuncionais pós-descongelamento – Avaliação *in vitro*;
- Comparar os índices de gestação obtidos a partir da inseminação artificial intra-uterina por cateterização endoscópica da cérvix com sêmen criopreservado com diferentes concentrações de glutatona reduzida – Avaliação *in vivo*.

## *Materials e Métodos*



## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido com reprodutores selecionados a partir de canis particulares, conforme regras submetidas ao julgamento da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

Para as avaliações *in vitro* e *in vivo*, o presente experimento foi dividido, respectivamente, em duas etapas: Etapa I – Criopreservação e Avaliação Seminal e Etapa II – Inseminação Artificial com Sêmen Criopreservado.

### 5.1 ETAPA I – CRIOPRESERVAÇÃO E AVALIAÇÃO SEMINAL

#### 5.1.1 Animais e Constituição dos Grupos Experimentais

Foram selecionados seis cães reprodutores com idade entre 2 e 7 anos, de raças variadas, sem alterações clínicas intercorrentes. Todos os cães foram submetidos ao espermograma prévio, com o intuito de atestar a qualidade seminal, a qual previa: concentração espermática mínima de 500 milhões de espermatozóides/ejaculado, motilidade espermática superior a 70% e vigor acima de 2. As amostras seminais que não contemplaram tais requisitos foram descartadas e o animal excluído do experimento.

Para a criopreservação do sêmen, foram realizadas duas colheitas com intervalo mínimo de uma semana, à exceção de um único cão, a partir do qual o sêmen foi congelado apenas uma vez. O sêmen de cada indivíduo foi dividido de forma a contemplar equivalentemente os 3 grupos experimentais:

- Grupo GSH0: diluidor sem glutathione reduzida;
- Grupo GSH10: diluidor contendo 10 mM de glutathione reduzida;
- Grupo GSH20: diluidor contendo 20 mM de glutathione reduzida.



### 5.1.2 Diluidor

O diluidor-base utilizado para a criopreservação foi o Tris-gema-citrato, cuja composição encontra-se descrita nos Anexos A e B. De acordo com o delineamento experimental, o diluidor-base foi suplementado com 10 mM de glutathiona reduzida, 20 mM de glutathiona reduzida ou mantido padrão (controle).

### 5.1.3 Congelação e Descongelção do Sêmen

O protocolo de criopreservação utilizado foi constituído de duas etapas: diluidor sem crioprotetor (Fração A – Anexo A) durante o resfriamento até 5°C e o diluidor contendo 10% de glicerol como agente crioprotetor (Fração B – Anexo B), na segunda etapa da criopreservação.

A colheita do sêmen foi realizada por meio da manipulação digital do pênis, sendo apenas a fração rica do ejaculado utilizada. O volume total de sêmen foi centrifugado (200 xg por 5 minutos) e o sobrenadante, descartado. O sedimento de espermatozóides foi ressuspendido em 300 µL da fração A sem antioxidante a 37°C. Após a determinação da concentração espermática (espermatozóides/µL), em câmara hematimétrica na diluição de 1:200, o sêmen diluído foi dividido em 3 partes iguais, de forma a contemplar os 3 grupos experimentais (GSH0, GSH10 e GSH20). Para cada amostra do sêmen diluído, foi acrescentada a fração A correspondente ao grupo experimental em um volume suficiente para atingir a concentração espermática de  $200 \times 10^6$  espermatozóides/mL. O volume da fração A foi fixado em no mínimo de 1 mL, para que fosse possível a confecção de pelo menos 4 palhetas por grupo experimental. Por este motivo, a adição inicial de 100 µL de fração A por grupo após a centrifugação não comprometeu as concentrações de glutathiona propostas.

Após diluição, os tubos com as amostras diluídas a 37°C foram colocados em beakers com água na mesma temperatura e levados à geladeira por aproximadamente 1 hora e 30 minutos, para serem submetidos ao resfriamento lento até 5°C. Após a refrigeração, foi adicionada a fração B (também a 5°C) às amostras de sêmen, em volume idêntico ao utilizado

para a fração A. Desta forma, foi atingida a concentração final de glicerol (5%) e a concentração espermática total de  $100 \times 10^6$  espermatozóides/mL.

As amostras foram mantidas a 5°C por 1 hora, tempo suficiente para ocorrer a glicerolização. O sêmen foi, então, envasado em palhetas de 0,5 mL, as quais foram lacradas com álcool polivinílico e mantidas em vapor de nitrogênio (-70°C) a 4 cm da coluna líquida por 20 minutos. Sequencialmente, as palhetas foram imersas no nitrogênio líquido, raqueadas e armazenadas em botijões criogênicos.

Após um período mínimo de 15 dias da congelação, as palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos e avaliadas de acordo com o protocolo que se segue.

#### 5.1.4 Avaliação do Sêmen Fresco, Pós-Refrigeração, Pós-glicerolização e Pós-Congelação

As amostras de sêmen foram avaliadas nos seguintes momentos do protocolo de criopreservação:

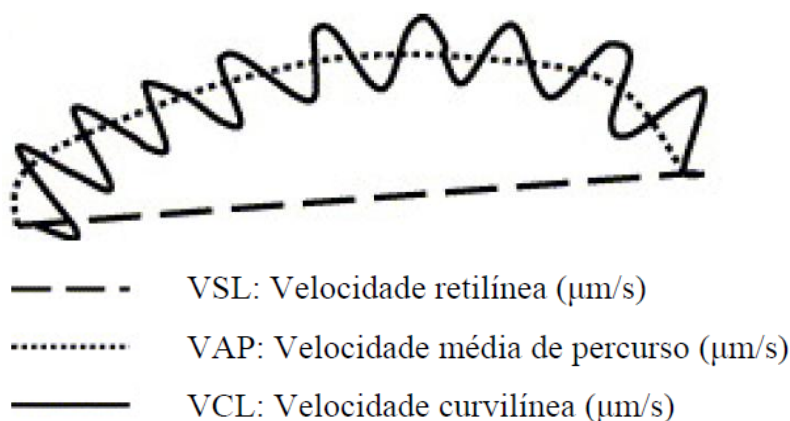
- sêmen fresco, imediatamente após a colheita;
- refrigeração, após as amostras atingirem a temperatura de 5°C na fração A;
- glicerolização, após 1 hora de estabilização na fração B (ou pré-envase);
- pós-descongelação, após a exposição ao nitrogênio líquido e descongelação.

Somente as amostras frescas foram avaliadas macroscopicamente quanto ao volume (mL), cor e odor. Todas as amostras foram avaliadas microscopicamente quanto à motilidade espermática subjetiva e ao vigor espermático. Para tanto, uma gota de 5 µL da amostra foi depositada entre lâmina e lamínula, previamente aquecidas a 37°C, para a observação em microscópio ótico sob aumento de 400 X (Nikon, Eclipse-E200).

Para análise computadorizada da motilidade (CASA), uma alíquota de 10 µL das amostras foi destinada ao aparelho Hamilton Thorne (CASA, HTR CEROS 12.1). Para a leitura, foram utilizados 5 µL em câmara de contagem e 8 campos foram selecionados aleatoriamente para análise das seguintes variáveis: VAP (µm/s; Figura 1), VSL (µm/s; Figura 1), VCL (µm/s; Figura 1), ALH (µm), BCF (Hz), STR (%), LIN (%); MOT (%), PROG (%) (Quadro 1). Os espermatozóides foram divididos em 4 grupos baseando-se na velocidade de deslocamento, que consistiu em: Rápidos (%RAP; VAP > 50 µm/s), Médios (%MED,

$30 \mu\text{m/s} < \text{VAP} < 50 \mu\text{m/s}$ ), Lentos (%SLOW;  $\text{VAP} < 30 \mu\text{m/s}$  ou  $\text{VSL} < 15 \mu\text{m/s}$ ) e espermatozoides imóveis (%STATIC).

Figura 1 – Ilustração da velocidade retilínea (VSL), velocidade média de percurso (VAP) e velocidade curvilínea (VCL)



Quadro 1 – Abreviações e seus respectivos significados das variáveis analisadas pelo CASA

	Terminologia	Significado
VAP	Velocidade média de percurso ( $\mu\text{m/s}$ )	Velocidade média do espermatozoide considerando-se um caminho suavizado
VSL	Velocidade retilínea ( $\mu\text{m/s}$ )	Distância mínima que o espermatozoide percorre durante o tempo entre duas avaliações.
VCL	Velocidade curvilínea ( $\mu\text{m/s}$ )	Média da velocidade espermática através do percurso real percorrido.
ALH	Amplitude do movimento lateral da cabeça ( $\mu\text{m}$ )	Comprimento médio da oscilação da cabeça do espermatozoide.
BCF	Frequência de batimento flagelar cruzado (Hz)	Frequência do movimento lateral, que faz com que a cabeça do espermatozoide cruze o percurso em ambas as direções.
STR	Retilinearidade (VSL/VAP, %)	Qualidade do movimento retilíneo suavizado percorrido.
LIN	Linearidade (VSL/VCL, %)	Qualidade do movimento retilíneo real percorrido.
MOT	Motilidade (%)	Porcentagem de células móveis.
PROG	Motilidade progressiva (%)	Porcentagem de células com motilidade progressiva.

Adaptado de GOOVAERTS et al. (2006)

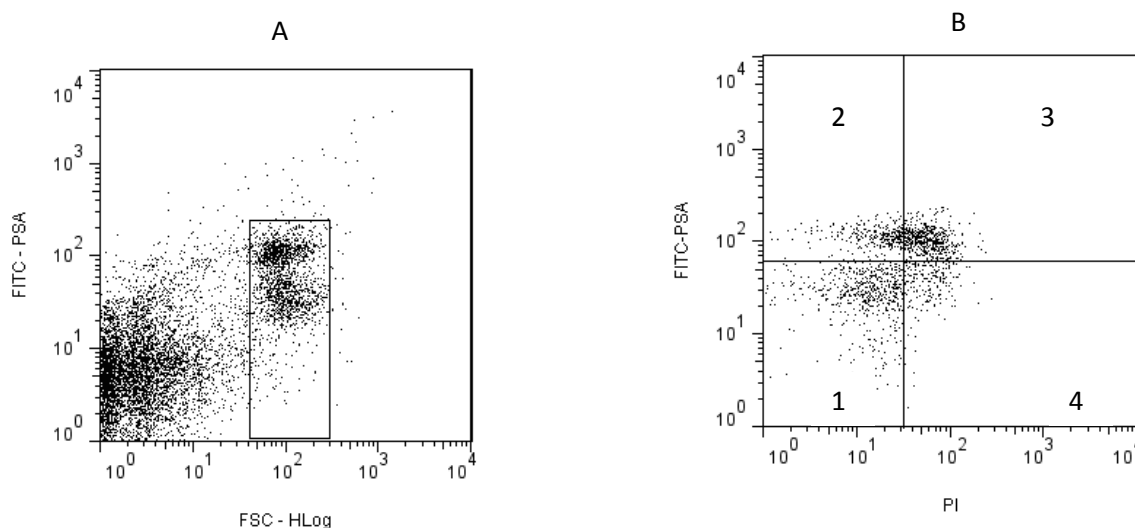
As patologias espermáticas foram avaliadas nas amostras frescas e descongeladas, por meio das técnicas a seguir arroladas:

- Preparação em Câmara Úmida (Formol Salino): uma alíquota (10  $\mu$ L) das amostras foi adicionada ao formol salino (10  $\mu$ L), ambos à temperatura de 37°C e, desta diluição, uma gota foi depositada entre lâmina e lamínula. Foram contadas 100 células e os defeitos de cabeça, peça intermediária e cauda dos espermatozóides expressos em porcentagem (%).
- Coloração de Eosina-Nigrosina ou Coloração Vital: 5 $\mu$ L do corante eosina, 10 $\mu$ L do corante nigrosina e 5 $\mu$ L das amostras foram depositados sobre uma lâmina pré-aquecida e, em seguida, realizado a extensão da mistura. Esta coloração permite a distinção de espermatozóides com integridade ou não de membrana plasmática, não-eosinofílicos e eosinofílicos, respectivamente, além da análise da morfologia espermática. Foram contadas 100 células em microscópio (Nikon, Eclipse-E200) no aumento de 1000 X (objetiva de imersão) e o número de espermatozóides com membrana plasmática íntegra e defeitos espermáticos expressos em porcentagem (%).
- A atividade mitocondrial foi avaliada por meio da técnica de oxidação da 3,3'-diaminobenzidina (DAB), por incubação de uma alíquota (30 $\mu$ L) das amostras com 30 $\mu$ L de DAB (1mg/mL de PBS) a 37°C durante 1 hora. Após este período, foram feitos esfregaços das amostras em lâmina de vidro e a fixação em formol 10% por 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas e armazenadas ao abrigo da luz. Os espermatozóides com elevada atividade mitocondrial apresentam maior deposição da DAB polimerizada na peça intermediária, caracterizada pela coloração marrom. Para a avaliação da atividade mitocondrial, 100 células foram contadas no microscópio óptico (Nikon, Eclipse-E200) com aumento de 1000 X e classificadas da seguinte maneira: Classe I - peça intermediária totalmente corada, correspondendo à alta atividade mitocondrial (DAB I); Classe II - células espermáticas com mais da metade dos segmentos corados (ativos), indicando atividade mitocondrial média a alta (DAB II); Classe III - células espermáticas com menos da metade da peça intermediária corada (ativa), indicando alto comprometimento da

atividade mitocondrial (DAB III) e Classe IV - peça intermediária sem coloração, indicando ausência de atividade mitocondrial (DAB IV).

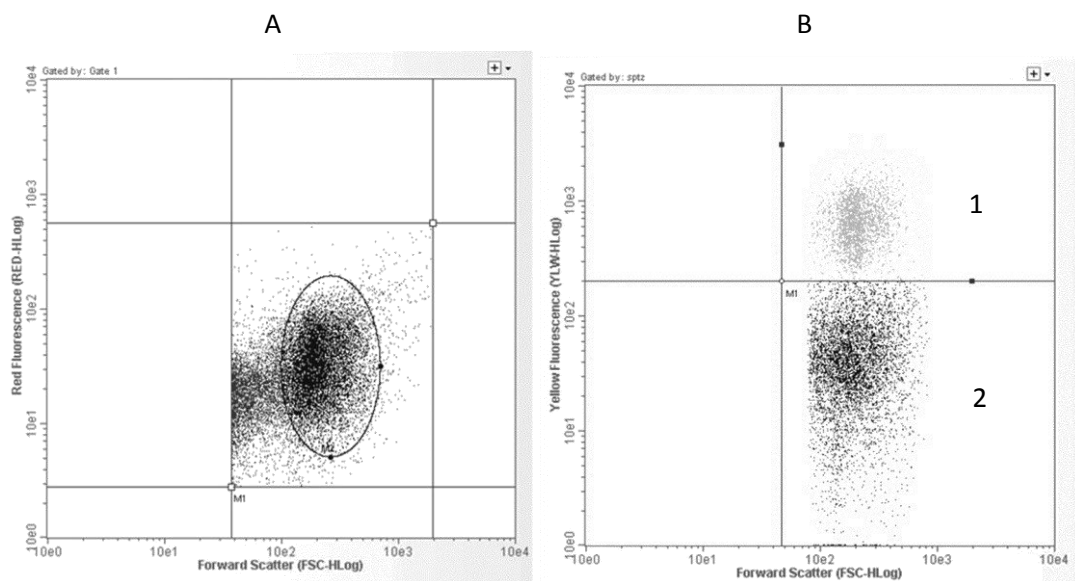
- Para os testes de viabilidade do sêmen, foi empregada a técnica da citometria de fluxo no aparelho Guava EasyCyte Mini® (GE) com uso de sondas fluorescentes. As sondas utilizadas foram previamente validadas para o sêmen canino. Para cada sonda, foram contadas 15.000 células:
- A integridade das membranas plasmática e acrossomal foi avaliada com as sondas de iodeto de propídio (PI) e aglutinina de *Psium sativum* conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA). Foram adicionados 50 µL de FITC-PSA e 2 µL de PI a 7 milhões de espermatozoides ressuspendidos em 150 µL de PBS. Após 10 minutos a 37°C, 850 µL de TALP foram adicionados à solução para posterior leitura no citômetro de fluxo. A população de espermatozoides foi selecionada na sonda FITC-PSA e posteriormente avaliada no gráfico de pontos com as colorações vermelho (PI) e verde (FITC-PSA - Figura 2). As populações foram classificadas como: sem marcação por sonda; marcada apenas com FITC-PSA, correspondendo à coloração verde; marcada apenas com a sonda PI, apresentando coloração vermelha; e com dupla marcação (FITC-PSA+PI - Figura 2). A lesão acrossomal foi caracterizada pela coloração verde e a alteração de membrana plasmática, por coloração vermelha.

Figura 2 – Seleção da população de espermatozoides pela sonda FITC-PSA (A) e separação das populações marcadas (B) com PI (1), com FITC (2), FITC/PI (3) e sem marcação (4)



- O potencial de membrana mitocondrial foi realizado com o uso da sonda JC1. Para tal, 2  $\mu\text{L}$  da sonda JC1 foram adicionados a 7 milhões de espermatozóides diluídos em 150  $\mu\text{L}$  de PBS. Após 10 minutos a 37°C, foram adicionados 850  $\mu\text{L}$  de TALP e efetuada a leitura em citômetro de fluxo. A população de espermatozóides foi selecionada na fluorescência vermelha e posteriormente avaliada no gráfico de pontos na fluorescência amarela (Figura 3). Os espermatozóides foram separados em duas populações: elevado-médio potencial de membrana mitocondrial e baixo potencial de membrana mitocondrial (Figura 3). Microscopicamente, o elevado potencial de membrana mitocondrial é indicado pela fluorescência vermelha, enquanto a fluorescência verde indica baixo potencial.

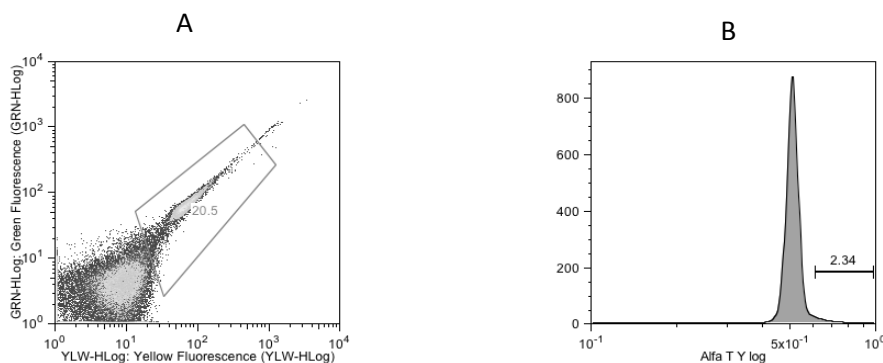
Figura 3 – Seleção da população de espermatozóides pela sonda JC1 (A) e separação das populações marcadas (B) com elevado potencial de membrana (1) e baixo potencial de membrana (2)



- A avaliação da fragmentação de DNA foi realizada por meio da sonda SCSA (Sperm Chromatine Structure Assay). Para tanto, um milhão de espermatozóides foi ressuspensionado em 200  $\mu\text{L}$  de tampão TNE, aos quais foram adicionados 400  $\mu\text{L}$  de detergente ácido por 30 segundos e, em seguida, foi adicionado 1,2 mL de laranja de acridina (LA). Após 3 a 5 minutos, foram realizadas as

leituras em citometria de fluxo. Os espermatozoides com fragmentação de DNA foram corados em vermelho (Figura 4).

Figura 4 – Seleção da população de espermatozoides pela sonda SCSA (A) e separação das populações marcadas (B) com fragmentação de DNA



### 5.1.5 Análise do Estresse Oxidativo

A análise do estresse oxidativo espontâneo e induzido foi realizada no Laboratório de Andrologia do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP. Para o estresse oxidativo espontâneo, uma alíquota de 400  $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA 10%) a 4°C foi adicionada a 200  $\mu$ L de sobrenadante da amostra seminal pré-centrifugada. A mistura novamente foi centrifugada (18000  $\times$ g, 15 minutos) para promover a precipitação das proteínas e o sobrenadante armazenado em freezer a -15°C para posterior análise.

Para o estresse oxidativo induzido, foi seguido o protocolo descrito por Nichi et al. (2007), para os quais 0,5 mL da suspensão previamente preparada contendo  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL em TALP foi incubado com sulfato ferroso (125  $\mu$ L, 4 mM) e ascorbato de sódio (125  $\mu$ L, 20 mM) por 1,5 horas a 37°C. Em seguida, foi adicionado TCA 10% a 4°C e a mistura foi centrifugada (18000  $\times$ g, 15 minutos) para promover a precipitação das proteínas. O sobrenadante foi armazenado em freezer a -15°C para posterior análise.

Para cada amostra seminal congelada, foi mensurada a concentração de malondialdeído (MDA), produto da peroxidação lipídica. Para tal, foi utilizado 500  $\mu$ L da

amostra diluída em 500 µL de ácido tiobarbitúrico a 1% (TBA, 1% diluído em 0,05N de hidróxido de sódio), mantido em banho-maria a 100°C por 15 minutos e, então, imediatamente resfriado em banho de gelo (0°C), para interrupção da reação química. As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram quantificadas por espectrofotometria com comprimento de onda de 532 nm (Ultrospec 3300 pro®, Amersham Biosciences).

## 5.2 ETAPA II – INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL COM SÊMEN CRIOPRESERVADO

### 5.2.1 Animais e Grupos Experimentais

Foram utilizadas 6 fêmeas caninas pluríparas, alocadas em dois grupos experimentais:

Grupo IA GSH0 (n=3): inseminação artificial com sêmen criopreservado em diluidor padrão, sem adição de GSH.

Grupo IA GSH10 (n=3): inseminação artificial com sêmen criopreservado em diluidor contendo 10 mM de GSH.

A inseminação artificial com sêmen criopreservado em diluidor contendo 20mM de glutatona não foi realizada na Etapa II do presente experimento uma vez que se verificou baixa qualidade seminal na avaliação *in vitro* pós-descongelação durante a Etapa I (vide Resultados).

### 5.2.2 Criopreservação Seminal

Para a inseminação artificial, foram criopreservadas individualmente amostras de sêmen de cães doadores. O protocolo de criopreservação e a avaliação seminal estão descritos nos itens 5.1.3 e 5.1.4.



### 5.2.3 Acompanhamento do Ciclo Estral e Momento da Inseminação

A partir da identificação visual do início do proestro, as fêmeas foram submetidas ao exame ginecológico em dias alternados, constituído por avaliação clínica do edema vulvar e corrimento vaginal sanguíneo, citologia vaginal e vaginoscopia. À aproximação do período transicional entre o proestro e o estro, o seguimento clínico foi diário e o acompanhamento do ciclo estral foi realizado por meio dos seguintes parâmetros:

- Citologia vaginal: foram consideradas fêmeas em estro quando o colpocitológico resultou em 90% de células superficiais queratinizadas e anucleadas (JOHNSTON; KUSTRITZ; OLSON, 2001).
- Vaginoscopia: a avaliação da mucosa vaginal foi realizada com uso de protoscópio pediátrico (Welch Allyn<sup>TM</sup>). Foi considerado o início do estro quando a mucosa vaginal apresentou-se pálida, com pregueamento primário evidente e início de pregueamento secundário. O momento da ovulação correspondeu à intensificação do pregueamento secundário ou crenulação (JOHNSTON; KUSTRITZ; OLSON, 2001).
- Dosagem sérica de progesterona e LH: a dosagem de progesterona foi realizada em laboratório clínico veterinário (Laboratório Provet, São Paulo-SP), utilizando-se a técnica de radioimunoensaio, previamente validada para a espécie canina. Foi estimado o pico de LH quando a dosagem de progesterona atingiu entre 1 e 1,9 ng/mL (JOHNSTON; KUSTRITZ; OLSON, 2001). A mesma amostra sanguínea utilizada para a dosagem de progesterona foi submetida ao teste para confirmação do pico de LH, utilizando o kit Witness LH (Symbiotics®, Figura 5), seguindo orientações do fabricante.

- Figura 5 – Kit Witness LH (Symbiotics®): (a) teste negativo e (b) teste positivo para o pico de LH
- 



A inseminação artificial intra-uterina foi realizada no 5º e 6º dia após o pico de LH, por meio de cateterização cervical com uso de endoscópio rígido Hopkins (Karl Storz®) conectado a um monitor de televisão (LG®), com sonda rígida de 5,7 mm de diâmetro e 29 cm de comprimento e cateter de inseminação transcervical Minitube® CH4 ou CH5.

Durante o procedimento, as fêmeas foram mantidas em estação, sem necessidade de sedação, apenas contidas para evitar movimentos bruscos ou tentativas de sentar (Figura 6). O endoscópio foi introduzido no vestíbulo vaginal, respeitando a angulação anatômica da vagina, e lentamente progredido para evitar lesões. A localização da cérvix foi realizada com o auxílio da visibilização da prega dorsal da vagina, por sua localização imediatamente cranial a esta última estrutura. Para as fêmeas com localização cervical lateralizada, foi necessário manobras com o endoscópio para o acesso ao óstio cervical pelo cateter de inseminação. Após a localização do óstio cervical, o cateter foi introduzido, em comprimento variável de acordo com o porte da fêmea, porém, de forma a permanecer no corpo uterino.

Figura 6 – Inseminação artificial por endoscopia transcervical em cadela



Para cada inseminação artificial, adotou-se a dose inseminante mínima de 150 milhões de espermatozoides viáveis. No momento da inseminação, as palhetas de sêmen foram descongeladas por 30 segundos a 37°C e as amostras depositadas em tubo cônico imerso em banho-maria a mesma temperatura. Após análise da motilidade e vigor espermáticos, o volume total das amostras foi aspirado com auxílio de seringa de 5 mL, e esta, imediatamente, acoplada ao cateter de inseminação artificial. O sêmen foi depositado lentamente, simultaneamente à observação da presença de refluxo cervical da amostra.

O diagnóstico da gestação foi realizado aos 30 dias após a inseminação por meio de avaliação ultrassonográfica. Após o parto, o número de filhotes foi contabilizado.

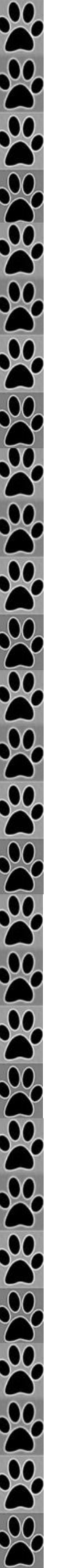
### 5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis respostas foram avaliadas por uso do Guide Data Analyses quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. Para as que não obedeceram tais premissas, foram realizadas transformações.

Para as variáveis seminais, o efeito do tempo (refrigeração, glicerolização e pós-descongelção), da concentração de GSH (0, 10 e 20 mM) e a interação tempo: concentração de GSH foram analisados pelo PROC MIXED. Para as variáveis com interação tempo: concentração de GSH, os efeitos foram avaliados separadamente (0 mM, 10 mM e 20 mM GSH X refrigeração, glicerolização e pós-descongelção). Nos demais casos, os fatores foram considerados conjuntamente (efeito tempo e efeito concentração de GSH).

Os efeitos dos diferentes tratamentos no tempo foram determinados pelo PROC GLM. Diferenças entre os tratamentos e tempos foram avaliadas por método paramétrico (teste LSD). A correlação de Spearman foi utilizada para calcular a relação entre os resultados das amostras nos diferentes tempos e tratamentos separadamente. Foi considerado significativo o valor de probabilidade  $p < 0,05$ . Os resultados foram descritos através de suas médias não transformadas  $\pm$  os erros padrões das médias (EPM).

## *Resultados*



## 6 RESULTADOS

Os resultados da avaliação *in vitro* (Etapa I) e da avaliação *in vivo* (Etapa II) estão apresentados separadamente.

### 6.1 ETAPA I

Os resultados dos testes *in vitro* foram divididos em: sêmen fresco; avaliação da interação entre as etapas da criopreservação seminal e os grupos experimentais (Tempo: Concentração de GSH); comparação entre os grupos experimentais ou concentração de glutatona reduzida (GSH0, GSH10 e GSH20); comparação das variáveis seminais entre os grupos experimentais ou concentração de glutatona reduzida (GSH0, GSH10 e GSH20) nas amostras pós-descongelamento e comparação entre as etapas de criopreservação seminal (refrigeração, glicerolização e pós-descongelamento).

#### 6.1.1 Sêmen fresco

A análise do sêmen fresco, imediatamente após a colheita, está apresentada nas tabelas 1 a 6, reforçando os critérios de inclusão para a posterior criopreservação.

Tabela 1 – Média e desvio padrão da motilidade subjetiva, vigor e concentração espermática do sêmen fresco - São Paulo - 2012

	Sêmen fresco
MOTILIDADE (%)	88,2 ±1,9
VIGOR (1-5)	3,7 ±0,1
CONCENTRAÇÃO (x10 <sup>6</sup> sptz/mL)	1096,8 ±1165,4

Tabela 2 - Média e desvio padrão dos defeitos espermáticos maiores, menores e totais analisados por meio das técnicas de Eosina-Nigrosina e Formol Salino no sêmen fresco - São Paulo - 2012

	Eosina-Nigrosina	Formol salino
DEFEITOS MAIORES (%)	16,0 ±7,7	13,2 ±8,47
DEFEITOS MENORES (%)	11,3 ±6	10,5 ±7,1
DEFEITOS TOTAIS (%)	27,4 ±10,3	23,8 ±10,7

Tabela 3 – Média e desvio padrão das variáveis seminais por análise computadorizada da motilidade (CASA) do sêmen fresco - São Paulo - 2012

	Sêmen fresco
VAP (µm/s)	116,3 ±8,5
VSL (µm/s)	99,2 ±8,0
VCL (µm/s)	167,7 ±11,4
ALH (µm)	6,6 ±0,4
BCF (Hz)	31,0 ±1,1
STR (%)	80,6 ±1,9
LIN (%)	58,5 ±3,5
MOT (%)	78,8 ±5,8
PROGR (%)	51,9 ±5,0
RAPID (%)	65,4 ±6,5
MEDIUM (%)	13,3 ±3,2
SLOW (%)	7,3 ±1,3
STATIC (%)	14,2 ±4,9

Tabela 4 – Média e desvio padrão da porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra, avaliada pela técnica da Eosina-Nigrosina, e da avaliação por citometria de fluxo das sondas FITC/PI (integridade de membranas) e SCSA (fragmentação de DNA) do sêmen fresco - São Paulo - 2012

	Sêmen fresco
MEMBRANA ÍNTEGRA E/N (%)	69,9 ±5,5
FITC/PI MI (%)	46,0 ±4,3
FITC/PI MP (%)	17,6 ±2,4
FITC/PI MA (%)	17,0 ±2,7
FITC/PI MPA (%)	19,3 ±3,8
SCSA - Fragmentação de DNA (%)	3,08 ±2,89
FITC/PI MI – membranas plasmática e acrossomal íntegras	
FITC/PI MP - membrana plasmática lesada	
FITC/PI MA – membrana acrossomal lesada	
FITC/PI MPA - membranas plasmática e acrossomal lesadas	

Tabela 5 – Média e desvio padrão da avaliação mitocondrial espermática por meio da oxidação da 3,3'-diaminobenzidina (DAB) e da sonda JC1 por citometria de fluxo do sêmen fresco - São Paulo - 2012

	Sêmen fresco
DAB I (%)	72,9 ±3,1
DAB II (%)	18,5 ±2,0
DAB III (%)	7,5 ±2,0
DAB IV (%)	0,7 ±0,3
JC1 ELEVADO (%)	52,7 ±2,4
JC1 BAIXO (%)	47,3 ±2,4

Tabela 6 – Média e desvio padrão da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) espontâneo (ng/mL) e induzido (ng/10<sup>6</sup>sptz) do sêmen fresco - São Paulo - 2012

	Sêmen fresco
TBARS ESPONTÂNEO	279,4 ±77,4
TBARS INDUZIDO	380,2 ±41,8

### 6.1.2 Avaliação da Interação entre as Etapas da Criopreservação Seminal e os Grupos Experimentais (Tempo: Concentração de GSH)

Foi detectada interação estatística ( $p < 0,05$ ) tempo: concentração de GSH apenas para a variável motilidade espermática subjetiva (Tabela 7).

Tabela 7 – Valores de probabilidade (p) para os efeitos principais *Etapas da Criopreservação Seminal* (Tempo) e *Grupos Experimentais* (Tratamento) e sua interação (Tratamento x Tempo) para as distintas variáveis seminais - São Paulo –2012

Variável	Tratamento	Tempo	Tratamento x Tempo
Motilidade subjetiva	0,0332	<0,0001	<b>0,0109</b>
Vigor	0,1226	<0,0001	0,2851
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	0,0667	<0,0001	0,7540
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	0,2430	<0,0001	0,8210
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	0,0009	<0,0001	0,2655
ALH ( $\mu\text{m}$ )	0,0012	0,0002	0,8284
BCF (Hz)	0,7485	0,0031	0,9313
STR (%)	0,5021	0,0540	0,9908
LIN (%)	0,3862	0,1541	0,9642
MOT (%)	0,0593	<0,0001	0,8490
PROGR (%)	0,1843	<0,0001	0,8829
RAPID (%)	0,1073	<0,0001	0,8931
MEDIUM (%)	0,4688	<0,0001	0,4563
SLOW (%)	0,1434	0,3180	0,5846
STATIC (%)	0,0613	<0,0001	0,9589
Íntegros E/N	0,6554	<0,0001	0,9851
TBARS induzido	0,5821	<0,0001	0,9402
TBARS espontâneo	0,4389	<0,0001	0,9027
JC1 elevado	0,7773	<0,0001	0,8849
JC1 baixo	0,8327	<0,0001	0,8971
Fragmentação	0,1128	0,0732	0,3491
FITC/PI íntegro	0,4741	0,5707	0,8025
FITC/PI MP	0,8068	0,0001	0,3331
FITC/PI MA	0,7889	0,0002	0,4061
FITC/PI MPA	0,5909	<0,0001	0,9464
DAB I	0,6507	<0,0001	0,5044
DAB II	0,1460	<0,0001	0,6655
DAB III	0,1450	0,0028	0,2474
DAB IV	0,1175	0,0098	0,7314

Ao analisar o efeito da interação entre as etapas da criopreservação e os grupos experimentais, evidencia-se que os espermatozoides descongelados sofrem decréscimo significativo da motilidade espermática subjetiva conforme aumenta a concentração de GSH.



Porém, a queda da motilidade é mais acentuada após a descongelação nos grupos suplementados com GSH, enquanto o grupo controle apresenta decréscimo progressivo ao longo do procedimento de criopreservação (Tabela 8).

Tabela 8 – Média e desvio padrão da motilidade espermática subjetiva (%) após refrigeração, glicerolização e pós-descongelação nos grupos GSH0, GSH10 e GSH20 - São Paulo – 2012

Grupo/Tempo	Refrigeração	Glicerolização	Pós-descongelação
<b>GSH0</b>	66,36±6,39 <sup>Aa</sup>	55±6,3 <sup>Aab</sup>	45±5,76 <sup>Ab</sup>
<b>GSH10</b>	58,63±4,91 <sup>Aa</sup>	60±5,55 <sup>Aa</sup>	28,63±5,68 <sup>Bb</sup>
<b>GSH20</b>	60,45±5,41 <sup>Aa</sup>	59,54±4,64 <sup>Aa</sup>	11±2,5 <sup>Cb</sup>

<sup>A, B e C</sup> Na mesma coluna indicam diferença estatística (p<0,05)

<sup>a e b</sup> na mesma linha indicam diferença estatística (p<0,05)

### 6.1.3 Comparação entre os Grupos Experimentais ou Concentração de Glutathiona Reduzida (GSH0, GSH10 e GSH20)

Não houve diferença estatística entre os grupos quanto à motilidade espermática subjetiva e o vigor espermático (Tabela 9). Por outro lado, o grupo GSH20 apresentou menor Velocidade Curvilínea em relação ao controle (131,5 µm/s ±5,4 e 152,1 µm/s ±5,5, respectivamente; Tabela 10). A Amplitude do movimento lateral da cabeça (ALH) foi superior no GSH0 (7,8 µm ±0,3), em comparação aos tratados (GSH10 - 6,9 µm ±0,3 e GSH20 - 6,6 µm ±0,3; Tabela 10). Ainda, o grupo GSH20 (13,5 % ± 2,2) apresentou menor porcentagem de espermatozoides com deslocamento lento (SLOW) em relação ao GSH10 (16,5 % ±2,0; Tabela 10).

Tabela 9 – Média e desvio padrão da motilidade subjetiva e vigor dos grupos GSH0, GSH10 e GSH20 - São Paulo - 2012

	GSH0	GSH10	GSH20
MOTILIDADE (%)	55,5 ±3,8	49,1 ±4,0	44,7 ±4,8
VIGOR	2,7 ±0,1	2,5 ±0,1	2,3 ±0,2

<sup>a,b,c</sup>: Letras diferentes indicam diferenças significativas dentro das linhas (p<0.05)

Tabela 10 – Média e desvio padrão das variáveis por análise computadorizada da motilidade (CASA) dos grupos GSH0, GSH10 e GSH20 - São Paulo – 2012

	GSH0	GSH10	GSH20
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	90,4 $\pm$ 3,9	88,1 $\pm$ 4,4	79,7 $\pm$ 4,2
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	73,6 $\pm$ 3,9	74,8 $\pm$ 4,5	66,6 $\pm$ 4,4
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	152,1 $\pm$ 5,5 <sup>a</sup>	137,9 $\pm$ 5,1 <sup>ab</sup>	131,5 $\pm$ 5,4 <sup>b</sup>
ALH ( $\mu\text{m}$ )	7,8 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	6,9 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	6,6 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>
BCF (Hz)	29,3 $\pm$ 1,0	29,4 $\pm$ 1,0	30,2 $\pm$ 0,8
STR (%)	75,2 $\pm$ 1,8	78,3 $\pm$ 1,8	76,6 $\pm$ 2,0
LIN (%)	47,5 $\pm$ 2,4	52,5 $\pm$ 2,6	49,8 $\pm$ 2,7
MOT (%)	53,8 $\pm$ 4,5	50,5 $\pm$ 4,5	44,8 $\pm$ 5,1
PROGR (%)	33,8 $\pm$ 3,7	35,1 $\pm$ 3,9	28,2 $\pm$ 4,1
RAPID (%)	42,4 $\pm$ 4,3	41,2 $\pm$ 4,5	34,4 $\pm$ 4,6
MEDIUM (%)	11,2 $\pm$ 1,2	9,3 $\pm$ 1,0	10,3 $\pm$ 1,5
SLOW (%)	14,7 $\pm$ 1,9 <sup>ab</sup>	16,5 $\pm$ 2,0 <sup>a</sup>	13,5 $\pm$ 2,2 <sup>b</sup>
STATIC (%)	31,7 $\pm$ 3,9	33,0 $\pm$ 3,8	42,9 $\pm$ 5,3

<sup>a,b,c</sup>: Letras diferentes indicam diferenças significativas dentro das linhas ( $p < 0.05$ )

Em relação à porcentagem de lesão das membranas plasmática e acrossomal, atividade mitocondrial e estresse oxidativo (TBARS), não houve diferença estatística entre os grupos experimentais (Tabela 11, 12 e 13). Por outro lado, o grupo GSH20 apresentou maior porcentagem de espermatozoides com fragmentação de DNA em relação ao grupo controle, porém, não diferiu do grupo GSH10 (Tabela 11).

Tabela 11 – Média e desvio padrão da porcentagem de espermatozoides com membrana íntegra avaliada pela técnica da Eosina-Nigrosina e avaliação por citometria de fluxo das sondas FITC/PI (integridade de membranas) e SCSA (fragmentação de DNA) dos grupos GSH0, GSH10 e GSH20 - São Paulo – 2012

	GSH0	GSH10	GSH20
VIVOS E/N (%)	58,8 $\pm$ 4,2	59,9 $\pm$ 4,4	55,0 $\pm$ 4,6
FITC/PI MI (%)	32,6 $\pm$ 2,4	36,6 $\pm$ 2,0	35,5 $\pm$ 2,6
FITC/PI MP (%)	11,9 $\pm$ 1,2	12,1 $\pm$ 1,2	11,9 $\pm$ 1,2
FITC/PI MA (%)	28,8 $\pm$ 3,4	26,6 $\pm$ 3,3	29,4 $\pm$ 3,7
FITC/PI MPA (%)	25,0 $\pm$ 2,2	24,7 $\pm$ 2,4	23,2 $\pm$ 2,5
SCSA – Fragmentação de DNA (%)	2,62 $\pm$ 1,6 <sup>b</sup>	3,32 $\pm$ 1,9 <sup>ab</sup>	3,80 $\pm$ 3,1 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup>: Letras diferentes indicam diferenças significativas dentro das linhas ( $p < 0.05$ )

FITC/PI MI – membranas plasmática e acrossomal íntegras

FITC/PI MP - membrana plasmática lesada

FITC/PI MA – membrana acrossomal lesada

FITC/PI MPA - membranas plasmática e acrossomal lesadas

Tabela 12 – Média e desvio padrão da atividade mitocondrial por oxidação da 3,3'-diaminobenzidina (DAB) e por avaliação da sonda JC1 em citometria de fluxo dos grupos GSH0, GSH10 e GSH20 - São Paulo – 2012

	GSH0	GSH10	GSH20
DAB I (%)	58,2 ±3,6	55,5 ±4,4	58,2 ±4,1
DAB II (%)	34,4 ±3,1	33,3 ±3,5	29,7 ±3,1
DAB III (%)	6,3 ±0,8	8,0 ±1,1	9,1 ±1,0
DAB IV (%)	1,1 ±0,2	3,1 ±1,3	3,3 ±0,7
JC1 ELEVADO (%)	33,0 ±3,5	34,5 ±3,3	32,5 ±3,2
JC1 BAIXO (%)	67,0 ±3,5	65,5 ±3,3	67,5 ±3,2

<sup>a,b,c</sup>: Letras diferentes indicam diferenças significativas dentro das linhas (p<0.05)

Tabela 13 – Média e desvio padrão da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) espontâneo e induzido dos grupos GSH0, GSH10 e GSH20 - São Paulo - 2012

	GSH0	GSH10	GSH20
TBARS ESPONTÂNEO (ng/mL)	2072,0 ±416,3	2090,7 ±440,2	2553,5 ±513,2
TBARS INDUZIDO (ng/10 <sup>6</sup> sptz)	465,2 ±29,0	500,5 ±39,9	503,7 ±25,4

<sup>a,b,c</sup>: Letras diferentes indicam diferenças significativas dentro das linhas (p<0.05)

Conforme os dados de correlação apresentados nas tabelas 14, 15 e 16, evidencia-se que nos grupos GSH10 e GSH20 a lesão de membrana plasmática *ou* acrossomal (FITC/PI MP e FITC/PI MA) correlacionaram de forma significativa e **positivamente** com a motilidade espermática subjetiva ( $r= 0,39$ ;  $r= 0,43$ ;  $r= 0,56$ ;  $r= 0,55$ , respectivamente, para GSH10 FITC/PI MP; GSH10 FITC/PI MA; GSH20 FITC/PI MP e GSH20 FITC/PI MA), a motilidade total ( $r= 0,48$ ;  $r= 0,46$ ;  $r= 0,49$ ;  $r= 0,47$ , respectivamente), a motilidade progressiva ( $r= 0,51$ ;  $r= 0,50$ ;  $r= 0,43$ ;  $r= 0,43$ , respectivamente), espermatozóides rápidos ( $r= 0,49$ ;  $r= 0,47$ ;  $r= 0,50$ ;  $r= 0,49$ , respectivamente) e vigor espermático ( $r= 0,52$ ;  $r= 0,56$ ;  $r= 0,64$ ;  $r= 0,66$ , respectivamente). Ainda, o grupo GSH10 apresentou correlação significativa e **positiva** entre FITC/PI MP e FITC/PI MA e espermatozóides com alta atividade mitocondrial (DAB I;  $r= 0,60$ ,  $r= 0,61$ , respectivamente); enquanto no grupo GSH20, a correlação foi significativa e **positiva** apenas entre lesão de membrana plasmática (FITC/PI MP) e espermatozóides DAB I ( $r= 0,43$ ). Nos grupos GSH10 e GSH20, foi verificada correlação significativa e **negativa** da lesão de membrana plasmática *ou* acrossomal com TBARS induzido ( $r= -0,45$ ;  $r= -0,43$ ;  $r= -0,58$ ;  $r= -0,51$ , respectivamente; Tabelas 15 e 16).

Apenas no grupo GSH20 a motilidade espermática subjetiva correlacionou **negativamente** com o TBARS induzido ( $r= -0,51$ ,  $p= 0,002$ ) e com a baixa atividade mitocondrial (JC1 baixo;  $r= -0,50$ ,  $p= 0,003$ ; Tabela 16).

Tabela 14 - Coeficientes de correlação e significância das variáveis obtidas na avaliação seminal do grupo GSH0 - São Paulo – 2012

	Motilidade	Vigor	Íntegros E/N	MOT	PROG	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	Rápido	Médio	Lento
<b>Motilidade</b>	1.00000	0.83098 <.0001	0.54654 0.0010	0.62673 <.0001	0.54585 0.0010	0.64949 <.0001	0.67223 <.0001	0.35511 0.0426	-0.03223 0.8587	-0.55317 0.0008	0.54916 0.0009	0.60232 0.0002	0.23230 0.1933	-0.28590 0.1068
<b>Vigor</b>		1.00000	0.52198 0.0018	0.55699 0.0008	0.51418 0.0022	0.56581 0.0006	0.61768 0.0001	0.22043 0.2177	-0.11830 0.5120	-0.53445 0.0014	0.50607 0.0027	0.52945 0.0015	0.21450 0.2306	-0.03494 0.8469
<b>Íntegros E/N</b>			1.00000	0.49176 0.0037	0.57838 0.0004	0.50213 0.0029	0.59453 0.0003	0.20793 0.2456	-0.03622 0.8414	-0.49480 0.0034	0.53152 0.0015	0.49009 0.0038	0.09059 0.6161	-0.18589 0.3003
<b>MOT</b>				1.00000	0.87428 <.0001	0.75037 <.0001	0.64352 <.0001	0.60541 0.0002	0.36798 0.0351	-0.57552 0.0005	0.24279 0.1734	0.96725 <.0001	0.31811 0.0712	-0.42017 0.0149
<b>PROG</b>					1.00000	0.79505 <.0001	0.78016 <.0001	0.51465 0.0022	0.13449 0.4556	-0.71281 <.0001	0.49352 0.0035	0.94378 <.0001	-0.09389 0.6033	-0.42031 0.0149
<b>VAP</b>						1.00000	0.94661 <.0001	0.72612 <.0001	0.21286 0.2343	-0.69328 <.0001	0.51061 0.0024	0.83082 <.0001	-0.14644 0.4161	-0.35398 0.0433
<b>VSL</b>							1.00000	0.52160 0.0019	-0.05867 0.7457	-0.73986 <.0001	0.74246 <.0001	0.73449 <.0001	-0.20618 0.2497	-0.37325 0.0324
<b>VCL</b>								1.00000	0.74771 <.0001	-0.21794 0.2231	0.00102 0.9955	0.64763 <.0001	-0.03273 0.8565	-0.23726 0.1837
<b>ALH</b>									1.00000	0.15659 0.3842	-0.52246 0.0018	0.31727 0.0720	0.25104 0.1588	-0.04408 0.8075
<b>BCF</b>										1.00000	-0.61809 0.0001	-0.67902 <.0001	0.27672 0.1190	0.28170 0.1122
<b>STR</b>											1.00000	0.32879 0.0617	-0.25981 0.1442	-0.37585 0.0311
<b>Rápido</b>												1.00000	0.06797 0.7070	-0.44130 0.0101
<b>Médio</b>													1.00000	-0.01962 0.9137
<b>Lento</b>														1.00000

Tabela 14 - Coeficientes de correlação e significância das variáveis obtidas na avaliação seminal do grupo GSH0 - São Paulo – 2012

	Estático	TB Ind	TB Esp	Fragm	JCIelev	JCI baixo	DAB I	DAB II	DAB III	DAB IV	FITC MI	FITC MA	FITC MP	FITC MPA
<b>Motilidade</b>	<b>-0.53854</b> 0.0012	-0.14075 0.4347	<b>-0.37870</b> 0.0357	-0.26657 0.1403	0.29748 0.0927	-0.27816 0.1170	<b>0.62752</b> 0.0001	<b>-0.57558</b> 0.0006	<b>-0.55395</b> 0.0010	-0.26278 0.1462	-0.19146 0.2858	0.05924 0.7433	0.11319 0.5306	-0.24275 0.1735
<b>Vigor</b>	<b>-0.52247</b> 0.0018	0.06696 0.7112	<b>-0.43848</b> 0.0136	<b>-0.36986</b> 0.0372	0.19797 0.2694	-0.17279 0.3363	<b>0.52810</b> 0.0019	<b>-0.46979</b> 0.0067	<b>-0.45840</b> 0.0083	-0.24321 0.1798	-0.09919 0.5829	0.05800 0.7485	0.09025 0.6174	-0.21850 0.2218
<b>Integros E/N</b>	<b>-0.40638</b> 0.0189	-0.10058 0.5776	<b>-0.52373</b> 0.0025	-0.21038 0.2478	<b>0.39384</b> 0.0233	<b>-0.37529</b> 0.0314	<b>0.65055</b> <.0001	<b>-0.56353</b> 0.0008	<b>-0.56335</b> 0.0008	-0.32877 0.0662	0.20553 0.2512	-0.28840 0.1036	-0.30233 0.0873	-0.04559 0.8011
<b>MOT</b>	<b>-0.92522</b> <.0001	<b>-0.36728</b> 0.0355	<b>-0.63558</b> 0.0001	-0.23394 0.1975	<b>0.56402</b> 0.0006	<b>-0.56472</b> 0.0006	<b>0.63578</b> <.0001	<b>-0.64630</b> <.0001	-0.32446 0.0700	-0.32781 0.0670	-0.03941 0.8276	0.11819 0.5124	0.10781 0.5504	-0.10490 0.5613
<b>PROG</b>	<b>-0.77506</b> <.0001	-0.26316 0.1390	<b>-0.50601</b> 0.0037	-0.29937 0.0960	<b>0.40469</b> 0.0195	<b>-0.40205</b> 0.0204	<b>0.63572</b> <.0001	<b>-0.64611</b> <.0001	-0.28912 0.1085	-0.32088 0.0734	-0.10657 0.5550	0.16925 0.3464	0.15583 0.3865	-0.08020 0.6573
<b>VAP</b>	<b>-0.63377</b> <.0001	-0.16289 0.3651	<b>-0.36873</b> 0.0412	<b>-0.35632</b> 0.0453	0.14740 0.4130	-0.14026 0.4362	<b>0.58219</b> 0.0005	<b>-0.57551</b> 0.0006	-0.26419 0.1440	-0.34091 0.0562	-0.24495 0.1695	-0.10357 0.5662	-0.09108 0.6142	0.13520 0.4531
<b>VSL</b>	<b>-0.49996</b> 0.0030	-0.03249 0.8576	-0.26608 0.1479	-0.32659 0.0681	0.05045 0.7804	-0.03896 0.8296	<b>0.59970</b> 0.0003	<b>-0.57493</b> 0.0006	<b>-0.33482</b> 0.0610	-0.28734 0.1108	-0.23780 0.1827	-0.13128 0.4665	-0.11835 0.5118	0.15065 0.4027
<b>VCL</b>	<b>-0.48309</b> 0.0044	-0.28845 0.1035	<b>-0.37195</b> 0.0394	<b>-0.40960</b> 0.0199	0.31464 0.0745	-0.32059 0.0689	0.33103 0.0642	-0.34012 0.0568	-0.04689 0.7988	-0.34939 0.0500	-0.22122 0.2160	-0.00913 0.9598	0.01113 0.9510	0.00312 0.9862
<b>ALH</b>	<b>-0.34408</b> 0.0499	-0.31165 0.0775	<b>-0.40888</b> 0.0224	-0.25842 0.1533	<b>0.47902</b> 0.0048	<b>-0.49562</b> 0.0034	0.11581 0.5279	-0.14851 0.4173	0.11890 0.5169	<b>-0.37324</b> 0.0354	0.03916 0.8287	-0.05120 0.7772	-0.04555 0.8013	-0.12009 0.5056
<b>BCF</b>	<b>0.52483</b> 0.0017	0.04149 0.8187	0.17649 0.3422	0.23251 0.2003	-0.06292 0.7280	0.04544 0.8018	<b>-0.37120</b> 0.0365	<b>0.39859</b> 0.0238	0.13806 0.4511	0.17525 0.3374	0.11657 0.5182	0.06059 0.7377	0.06111 0.7355	-0.12062 0.5037
<b>STR</b>	-0.05133 0.7767	0.22410 0.2099	0.07090 0.7047	-0.21902 0.2285	-0.10801 0.5497	0.12160 0.5002	<b>0.40072</b> 0.0230	<b>-0.35438</b> 0.0466	-0.34241 0.0551	-0.09945 0.5881	-0.22723 0.2035	-0.08089 0.6545	-0.06002 0.7400	0.13451 0.4555
<b>Rápido</b>	<b>-0.88018</b> <.0001	<b>-0.34856</b> 0.0468	<b>-0.57430</b> 0.0007	-0.28378 0.1155	<b>0.47681</b> 0.0050	<b>-0.47590</b> 0.0051	<b>0.61029</b> 0.0002	<b>-0.62176</b> 0.0001	-0.27640 0.1257	-0.34005 0.0569	-0.13226 0.4631	0.15809 0.3796	0.14937 0.4067	-0.06616 0.7145
<b>Médio</b>	-0.34160 0.0517	-0.15238 0.3972	-0.34765 0.0553	0.16279 0.3733	<b>0.42832</b> 0.0129	<b>-0.43497</b> 0.0114	0.22535 0.2149	-0.21739 0.2320	-0.27835 0.1229	0.01226 0.9469	0.30979 0.0794	-0.12652 0.4829	-0.12886 0.4748	-0.16436 0.3607
<b>Lento</b>	0.15967 0.3748	0.13362 0.4585	0.03347 0.8581	0.14858 0.4170	-0.24804 0.1640	0.27414 0.1226	<b>-0.39482</b> 0.0253	<b>0.41781</b> 0.0173	0.09283 0.6133	0.25194 0.1642	0.22904 0.1998	-0.15224 0.3977	-0.18328 0.3073	0.18381 0.3059

Tabela 14 - Coeficientes de correlação e significância das variáveis obtidas na avaliação seminal do grupo GSH0 - São Paulo – 2012

	Estático	TB Ind	TB Esp	Fragm	JC1 elev	JC1 baixo	DAB I	DAB II	DAB III	DAB IV	FITC MI	FITC MA	FITC MP	FITC MPA
<b>Estático</b>	1.00000	0.34110 0.0521	<b>0.65869</b> <b>&lt;.0001</b>	0.14957 0.4139	<b>-0.48176</b> <b>0.0045</b>	<b>0.47592</b> <b>0.0051</b>	<b>-0.54401</b> <b>0.0013</b>	<b>0.57217</b> <b>0.0006</b>	0.24151 0.1830	0.28413 0.1150	-0.10322 0.5676	-0.07553 0.6761	-0.04473 0.8048	0.08184 0.6507
<b>TB Ind</b>		1.00000	0.32238 0.0769	-0.12966 0.4794	<b>-0.43890</b> <b>0.0106</b>	<b>0.45427</b> <b>0.0079</b>	-0.34428 0.0537	0.32343 0.0710	0.25240 0.1634	0.15649 0.3924	0.17293 0.3359	-0.18087 0.3138	-0.24379 0.1716	0.19043 0.2885
<b>TB Esp</b>			1.00000	0.29414 0.1146	<b>-0.69673</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>0.68968</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>-0.64901</b> <b>0.0001</b>	<b>0.63735</b> <b>0.0002</b>	0.25373 0.1761	<b>0.56275</b> <b>0.0012</b>	-0.33621 0.0644	-0.12161 0.5146	-0.08172 0.6621	0.35263 0.0517
<b>Fragm</b>				1.00000	-0.04812 0.7937	0.05338 0.7717	-0.19801 0.2856	0.26500 0.1497	-0.21681 0.2414	0.27796 0.1300	0.08284 0.6522	-0.05761 0.7541	-0.05960 0.7459	0.17506 0.3379
<b>JC1 elev</b>					1.00000	-0.99784 <b>&lt;.0001</b>	<b>0.49641</b> <b>0.0039</b>	<b>-0.45933</b> <b>0.0082</b>	-0.33342 0.0622	<b>-0.40263</b> <b>0.0223</b>	0.17293 0.3359	0.25076 0.1593	0.24077 0.1771	<b>-0.47362</b> <b>0.0054</b>
<b>JC1 baixo</b>						1.00000	<b>-0.49668</b> <b>0.0038</b>	<b>0.46119</b> <b>0.0079</b>	0.32404 0.0704	<b>0.41289</b> <b>0.0188</b>	-0.33621 0.0644	-0.25374 0.1542	-0.24311 0.1728	<b>0.48006</b> <b>0.0047</b>
<b>DAB I</b>							1.00000	<b>-0.96137</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>-0.58479</b> <b>0.0004</b>	<b>-0.54953</b> <b>0.0011</b>	-0.06206 0.7358	-0.03441 0.8517	-0.09139 0.6189	-0.26019 0.1504
<b>DAB II</b>								1.00000	<b>0.36699</b> <b>0.0388</b>	<b>0.48131</b> <b>0.0053</b>	0.05683 0.7574	0.03932 0.8308	0.09594 0.6014	0.23102 0.2033
<b>DAB III</b>									1.00000	0.27655 0.1255	0.05228 0.7763	0.00987 0.9572	0.13577 0.4587	0.13577 0.4587
<b>DAB IV</b>										1.00000	-0.06620 0.7189	-0.04977 0.7868	0.31203 0.0821	0.31203 0.0821
<b>FITC MI</b>											1.00000	-0.23435 0.1893	-0.37220 0.0329	-0.20978 0.2413
<b>FITC MA</b>												1.00000	<b>0.97583</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>-0.49922</b> <b>0.0031</b>
<b>FITC MP</b>													1.00000	<b>-0.53897</b> <b>0.0012</b>
<b>FITC MPA</b>														1.00000

Tabela 15 - Coeficientes de correlação e significância das variáveis obtidas na avaliação seminal do grupo GSH10 - São Paulo – 2012

	Motilidade	Vigor	Íntegros E/N	MOT	PROG	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	Rápido	Médio	Lento
<b>Motilidade</b>	1.00000	0.76655 <.0001	0.55008 0.0009	0.61036 0.0002	0.66759 <.0001	0.64687 <.0001	0.68208 <.0001	0.49784 0.0032	-0.21781 0.2234	-0.48904 0.0039	0.53214 0.0014	0.60050 0.0002	0.02527 0.8890	-0.31491 0.0743
<b>Vigor</b>		1.00000	0.68793 <.0001	0.57688 0.0004	0.66116 <.0001	0.56025 0.0007	0.60863 0.0002	0.42497 0.0137	-0.34818 0.0471	-0.36910 0.0345	0.57276 0.0005	0.57778 0.0004	-0.01904 0.9162	-0.13590 0.4508
<b>Integros E/N</b>			1.00000	0.55560 0.0008	0.65806 <.0001	0.56579 0.0006	0.62205 0.0001	0.35207 0.0445	-0.41426 0.0165	-0.34971 0.0460	0.58272 0.0004	0.56507 0.0006	-0.04797 0.7910	-0.28630 0.1063
<b>MOT</b>				1.00000		0.86417 <.0001	0.75854 <.0001	0.82133 <.0001	0.07623 0.6733	-0.58877 0.0003	0.28655 0.1059	0.97505 <.0001	0.08322 0.6452	-0.48556 0.0042
<b>PROG</b>					1.00000	0.89436 <.0001	0.86368 <.0001	0.68536 <.0001	-0.16947 0.3458	-0.69905 <.0001	0.51814 0.0020	0.96388 <.0001	-0.28101 0.1132	-0.41122 0.0174
<b>VAP</b>						1.00000	0.96974 <.0001	0.77291 <.0001	-0.19490 0.2771	-0.71882 <.0001	0.59507 0.0003	0.90297 <.0001	-0.19196 0.2845	-0.51211 0.0023
<b>VSL</b>							1.00000	0.63216 <.0001	-0.39396 0.0233	-0.73471 <.0001	0.75780 <.0001	0.81881 <.0001	-0.28236 0.1114	-0.45936 0.0072
<b>VCL</b>								1.00000	0.30481 0.0846	-0.36495 0.0368	0.12198 0.4989	0.78725 <.0001	0.12678 0.4820	-0.46062 0.0070
<b>ALH</b>									1.00000	0.31376 0.0754	-0.80319 <.0001	-0.00200 0.9912	0.33111 0.0598	0.05864 0.7458
<b>BCF</b>										1.00000	-0.54731 0.0010	-0.67030 <.0001	0.37754 0.0303	0.52107 0.0019
<b>STR</b>											1.00000	0.38223 0.0282	-0.42329 0.0141	-0.31081 0.0783
<b>Rápido</b>												1.00000	-0.13964 0.4383	-0.48584 0.0042
<b>Médio</b>													1.00000	0.01219 0.9463
<b>Lento</b>														1.00000

Tabela 15 - Coeficientes de correlação e significância das variáveis obtidas na avaliação seminal do grupo GSH10 - São Paulo – 2012

	Estático	TB Ind	TB Esp	Fragm	JCIelev	JCI baixo	DAB I	DAB II	DAB III	DAB IV	FITC MI	FITC MA	FITC MP	FITC MPA
<b>Motilidade</b>	<b>-0.45492</b> <b>0.0078</b>	-0.19493 0.2770	<b>-0.53569</b> <b>0.0027</b>	-0.27874 0.1162	0.28903 0.1028	-0.28987 0.1018	<b>0.65014</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>-0.52709</b> <b>0.0019</b>	<b>-0.44808</b> <b>0.0101</b>	<b>-0.40221</b> <b>0.0225</b>	0.14231 0.4295	<b>0.43013</b> <b>0.0125</b>	<b>0.39459</b> <b>0.0231</b>	<b>-0.44021</b> <b>0.0104</b>
<b>Vigor</b>	<b>-0.42801</b> <b>0.0130</b>	-0.19250 0.2832	<b>-0.43101</b> <b>0.0196</b>	-0.06483 0.7200	0.31884 0.0705	-0.32742 0.0629	<b>0.68523</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>-0.49918</b> <b>0.0036</b>	<b>-0.65041</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>-0.45414</b> <b>0.0090</b>	-0.09567 0.5964	<b>0.56795</b> <b>0.0006</b>	<b>0.51793</b> <b>0.0020</b>	-0.30001 0.0898
<b>Integros E/N</b>	<b>-0.38322</b> <b>0.0277</b>	-0.07270 0.6876	<b>-0.42665</b> <b>0.0210</b>	-0.09372 0.6039	0.31449 0.0747	-0.32841 0.0620	<b>0.56907</b> <b>0.0007</b>	<b>-0.43271</b> <b>0.0134</b>	<b>-0.44474</b> <b>0.0108</b>	<b>-0.42125</b> <b>0.0163</b>	-0.12551 0.4864	<b>0.36614</b> <b>0.0361</b>	<b>0.36279</b> <b>0.0380</b>	-0.22932 0.1992
<b>MOT</b>	<b>-0.90946</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>-0.34675</b> <b>0.0480</b>	<b>-0.69117</b> <b>&lt;.0001</b>	-0.27965 0.1150	0.32392 0.0659	0.21409 0.2316	<b>0.67127</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>-0.61856</b> <b>0.0002</b>	-0.23123 0.2029	<b>-0.41386</b> <b>0.0185</b>	-0.14814 0.4106	<b>0.46869</b> <b>0.0059</b>	<b>0.48005</b> <b>0.0047</b>	<b>-0.39077</b> <b>0.0245</b>
<b>PROG</b>	<b>-0.81184</b> <b>&lt;.0001</b>	-0.28059 0.1137	<b>-0.59436</b> <b>0.0007</b>	<b>-0.38813</b> <b>0.0256</b>	-0.32978 0.0609	-0.22168 0.2150	<b>0.62328</b> <b>0.0001</b>	<b>-0.58151</b> <b>0.0005</b>	-0.21994 0.2264	<b>-0.39117</b> <b>0.0268</b>	-0.13293 0.4608	<b>0.50722</b> <b>0.0026</b>	<b>0.51731</b> <b>0.0020</b>	<b>-0.44110</b> <b>0.0102</b>
<b>VAP</b>	<b>-0.75513</b> <b>&lt;.0001</b>	-0.23367 0.1906	<b>-0.56426</b> <b>0.0014</b>	<b>-0.45017</b> <b>0.0086</b>	0.05178 0.7748	-0.05776 0.7495	<b>0.52714</b> <b>0.0019</b>	<b>-0.46438</b> <b>0.0074</b>	-0.23205 0.2013	-0.32936 0.0657	-0.07903 0.6620	0.27681 0.1189	0.28688 0.1055	-0.27916 0.1157
<b>VSL</b>	<b>-0.63211</b> <b>&lt;.0001</b>	-0.12700 0.4813	<b>-0.46331</b> <b>0.0114</b>	<b>-0.47621</b> <b>0.0051</b>	-0.03041 0.8666	0.02431 0.8932	<b>0.47712</b> <b>0.0058</b>	<b>-0.38641</b> <b>0.0289</b>	-0.30351 0.0913	-0.31820 0.0759	-0.07337 0.6849	0.24900 0.1623	0.25356 0.1545	-0.25665 0.1494
<b>VCL</b>	<b>-0.73874</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>-0.45303</b> <b>0.0081</b>	<b>-0.67544</b> <b>&lt;.0001</b>	-0.26907 0.1300	0.25686 0.1490	-0.26330 0.1387	<b>0.53710</b> <b>0.0015</b>	<b>-0.52026</b> <b>0.0023</b>	-0.11760 0.5215	-0.27873 0.1224	-0.10339 0.5670	<b>0.36367</b> <b>0.0375</b>	<b>0.37481</b> <b>0.0316</b>	-0.27815 0.1170
<b>ALH</b>	-0.16969 0.3451	<b>-0.41231</b> <b>0.0171</b>	-0.31407 0.0971	0.14537 0.4196	0.23254 0.1928	-0.22786 0.2022	0.09866 0.5911	-0.24218 0.1817	<b>0.37716</b> <b>0.0333</b>	0.09062 0.6218	0.10800 0.5497	0.04529 0.8024	0.04371 0.8092	-0.02704 0.8813
<b>BCF</b>	<b>0.47791</b> <b>0.0049</b>	0.09601 0.5951	0.27644 0.1466	<b>0.54501</b> <b>0.0010</b>	0.12669 0.4823	-0.12678 0.4820	-0.29219 0.1046	0.31078 0.0834	-0.04333 0.8138	0.20342 0.2641	0.01035 0.9544	-0.16863 0.3482	-0.18982 0.2900	0.27748 0.1180
<b>STR</b>	-0.10137 0.5746	0.23370 0.1905	0.05754 0.7668	<b>-0.43311</b> <b>0.0118</b>	-0.23124 0.1954	0.22408 0.2100	0.18284 0.3165	0.02543 0.8901	<b>-0.44905</b> <b>0.0099</b>	-0.34896 0.0503	-0.17788 0.3220	0.12286 0.4958	0.11639 0.5189	-0.02553 0.8878
<b>Rápido</b>	<b>-0.88966</b> <b>&lt;.0001</b>	-0.33635 0.0556	<b>-0.64334</b> <b>0.0002</b>	<b>-0.36583</b> <b>0.0363</b>	0.24597 0.1676	-0.25269 0.1560	<b>0.63450</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>-0.59493</b> <b>0.0003</b>	-0.18642 0.3070	<b>-0.39829</b> <b>0.0240</b>	-0.14822 0.4104	<b>0.47982</b> <b>0.0047</b>	<b>0.49535</b> <b>0.0034</b>	<b>-0.41235</b> <b>0.0171</b>
<b>Médio</b>	-0.05988 0.7407	-0.03267 0.8568	-0.25085 0.1893	<b>0.38682</b> <b>0.0262</b>	0.33075 0.0601	-0.32636 0.0638	0.15475 0.3977	-0.09921 0.5890	-0.20380 0.2632	-0.05924 0.7474	-0.01168 0.9486	-0.07388 0.6828	-0.09080 0.6153	0.12315 0.4948
<b>Lento</b>	0.20312 0.2569	0.09241 0.6090	-0.02930 0.8801	<b>0.49693</b> <b>0.0033</b>	-0.04015 0.8244	0.04676 0.7961	-0.32517 0.0694	0.19196 0.2926	0.08563 0.6412	<b>0.55144</b> <b>0.0011</b>	0.09117 0.6138	-0.20115 0.2617	-0.22942 0.1990	0.18638 0.2990



Tabela 15: Coeficientes de correlação e significância das variáveis obtidas na avaliação seminal do grupo GSH10. São Paulo – 2012

	Estático	TB Ind	TB Esp	Fragm	JC1 elev	JC1 baixo	DAB I	DAB II	DAB III	DAB IV	FITC MI	FITC MA	FITC MP	FITC MPA
<b>Estático</b>	1.00000	<b>0.34637</b> <b>0.0483</b>	<b>0.78071</b> <b>&lt;.0001</b>	0.19786 0.2697	-0.25303 0.1554	0.25613 0.1502	<b>-0.50970</b> <b>0.0029</b>	<b>0.56505</b> <b>0.0008</b>	0.12468 0.4966	0.07746 0.6735	0.03502 0.8466	<b>-0.35563</b> <b>0.0422</b>	<b>-0.36152</b> <b>0.0387</b>	<b>0.36386</b> <b>0.0374</b>
<b>TB Ind</b>		1.00000	<b>0.43099</b> <b>0.0196</b>	0.05324 0.7686	-0.20882 0.2435	0.20507 0.2523	<b>-0.45565</b> <b>0.0088</b>	<b>0.51324</b> <b>0.0027</b>	-0.01676 0.9274	0.10834 0.5550	0.05454 0.7631	<b>-0.43828</b> <b>0.0107</b>	<b>-0.45563</b> <b>0.0077</b>	0.32558 0.0645
<b>TB Esp</b>			1.00000	-0.03127 0.8721	<b>-0.37536</b> <b>0.0448</b>	<b>0.38396</b> <b>0.0398</b>	<b>-0.62911</b> <b>0.0003</b>	<b>0.75823</b> <b>&lt;.0001</b>	0.06952 0.7252	-0.08561 0.6649	<b>-0.36262</b> <b>0.0532</b>	-0.32491 0.0855	-0.31984 0.0908	<b>0.49453</b> <b>0.0064</b>
<b>Fragm</b>				1.00000	<b>0.45445</b> <b>0.0079</b>	<b>-0.44902</b> <b>0.0088</b>	0.03259 0.8594	-0.05512 0.7645	-0.08421 0.6468	0.10991 0.5493	-0.14012 0.4367	-0.00003 0.9999	0.01114 0.9510	0.10010 0.5794
<b>JC1 elev</b>					1.00000	<b>-0.99922</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>0.44394</b> <b>0.0109</b>	<b>-0.45616</b> <b>0.0087</b>	-0.10445 0.5694	-0.18568 0.3089	-0.15995 0.3739	<b>0.35293</b> <b>0.0439</b>	<b>0.38277</b> <b>0.0279</b>	-0.31613 0.0731
<b>JC1 baixo</b>						1.00000	<b>-0.44728</b> <b>0.0103</b>	<b>0.45337</b> <b>0.0092</b>	0.10545 0.5657	0.19824 0.2768	0.15215 0.3979	<b>-0.35512</b> <b>0.0426</b>	<b>-0.38324</b> <b>0.0277</b>	0.31634 0.0729
<b>DAB I</b>							1.00000	<b>-0.90858</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>-0.56910</b> <b>0.0007</b>	<b>-0.42646</b> <b>0.0149</b>	0.00042 0.9982	<b>0.61936</b> <b>0.0002</b>	<b>0.60589</b> <b>0.0002</b>	<b>-0.60180</b> <b>0.0003</b>
<b>DAB II</b>								1.00000	0.33058 0.0646	0.08853 0.6299	-0.07390 0.6877	<b>-0.52716</b> <b>0.0019</b>	<b>-0.54139</b> <b>0.0014</b>	<b>0.67433</b> <b>&lt;.0001</b>
<b>DAB III</b>									1.00000	0.29081 0.1064	0.06192 0.7364	<b>-0.42637</b> <b>0.0150</b>	<b>-0.36403</b> <b>0.0405</b>	0.22780 0.2099
<b>DAB IV</b>										1.00000	0.28382 0.1154	<b>-0.40870</b> <b>0.0202</b>	<b>-0.38333</b> <b>0.0303</b>	0.02199 0.9049
<b>FITC MI</b>											1.00000	-0.22496 0.2081	-0.30685 0.0824	-0.32624 0.0639
<b>FITC MA</b>												1.00000	<b>0.98654</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>-0.69182</b> <b>&lt;.0001</b>
<b>FITC MP</b>													1.00000	<b>-0.69856</b> <b>&lt;.0001</b>
<b>FITC MPA</b>														1.00000

Tabela 16 - Coeficientes de correlação e significância das variáveis obtidas na avaliação seminal do grupo GSH20 - São Paulo – 2012

	Motilidade	Vigor	Íntegros E/N	MOT	PROG	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	Rápido	Médio	Lento
<b>Motilidade</b>	1.00000	<b>0.80421</b> <.0001	<b>0.66172</b> <.0001	<b>0.84210</b> <.0001	<b>0.74695</b> <.0001	<b>0.61955</b> <b>0.0002</b>	<b>0.54888</b> <b>0.0011</b>	<b>0.62689</b> <b>0.0002</b>	0.05312 0.7765	-0.18831 0.3020	<b>0.23706</b> <b>0.1914</b>	<b>0.80241</b> <.0001	<b>0.38377</b> <b>0.0301</b>	0.00859 0.9628
<b>Vigor</b>		1.00000	<b>0.54688</b> <b>0.0012</b>	<b>0.71519</b> <.0001	<b>0.59766</b> <b>0.0003</b>	<b>0.46010</b> <b>0.0081</b>	<b>0.43259</b> <b>0.0134</b>	0.35308 0.0514	-0.09444 0.6133	-0.07455 0.6851	0.28457 0.1144	<b>0.64921</b> <.0001	<b>0.41790</b> <b>0.0173</b>	0.11286 0.5385
<b>Integros E/N</b>			1.00000	<b>0.55522</b> <b>0.0010</b>	<b>0.56083</b> <b>0.0008</b>	<b>0.47177</b> <b>0.0064</b>	<b>0.48507</b> <b>0.0049</b>	0.33954 0.0617	-0.18935 0.3076	-0.14185 0.4387	<b>0.41038</b> <b>0.0197</b>	<b>0.55391</b> <b>0.0010</b>	0.17917 0.3265	0.05230 0.7726
<b>MOT</b>				1.00000	<b>0.87242</b> <.0001	<b>0.78430</b> <.0001	<b>0.70133</b> <.0001	<b>0.64057</b> <b>0.0001</b>	0.01213 0.9484	-0.14392 0.4320	<b>0.35399</b> <b>0.0468</b>	<b>0.95641</b> <.0001	<b>0.44334</b> <b>0.0110</b>	0.09274 0.6137
<b>PROG</b>					1.00000	<b>0.84333</b> <.0001	<b>0.86972</b> <.0001	<b>0.43818</b> <b>0.0137</b>	-0.33140 0.0686	-0.42972 <b>0.0141</b>	<b>0.65620</b> <.0001	<b>0.95714</b> <.0001	0.00857 0.9629	0.03068 0.8676
<b>VAP</b>						1.00000	<b>0.96110</b> <.0001	<b>0.68678</b> <.0001	-0.13053 0.4840	-0.43508 <b>0.0128</b>	<b>0.59696</b> <b>0.0003</b>	<b>0.86063</b> <.0001	0.01060 0.9541	0.03803 0.8363
<b>VSL</b>							1.00000	<b>0.46366</b> <b>0.0086</b>	-0.37232 <b>0.0391</b>	-0.50682 <b>0.0031</b>	<b>0.77219</b> <.0001	<b>0.81411</b> <.0001	-0.12930 0.4806	0.06967 0.7048
<b>VCL</b>								1.00000	<b>0.56964</b> <b>0.0008</b>	-0.21414 0.2474	-0.15187 0.4148	<b>0.60459</b> <b>0.0003</b>	0.28784 0.1164	-0.19647 0.2895
<b>ALH</b>									1.00000	0.34144 0.0601	-0.81001 <.0001	-0.14386 0.4401	<b>0.48450</b> <b>0.0057</b>	0.01807 0.9231
<b>BCF</b>										1.00000	-0.41345 <b>0.0187</b>	-0.33937 0.0574	<b>0.56275</b> <b>0.0008</b>	<b>0.43185</b> <b>0.0136</b>
<b>STR</b>											1.00000	<b>0.50181</b> <b>0.0034</b>	-0.35120 <b>0.0487</b>	0.15809 0.3875
<b>Rápido</b>												1.00000	0.16258 0.3740	-0.00303 0.9869
<b>Médio</b>													1.00000	0.32712 0.0676
<b>Lento</b>														1.00000

Tabela 16 - Coeficientes de correlação e significância das variáveis obtidas na avaliação seminal do grupo GSH20 - São Paulo – 2012

	Estático	TB Ind	TB Esp	Fragm	JCIelev	JCI baixo	DAB I	DAB II	DAB III	DAB IV	FITC MI	FITC MA	FITC MP	FITC MPA
<b>Motilidade</b>	<b>-0.75488</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>-0.51113</b> <b>0.0028</b>	<b>-0.46164</b> <b>0.0117</b>	-0.12220 0.5053	<b>0.51442</b> <b>0.0026</b>	<b>-0.50812</b> <b>0.0030</b>	<b>0.87341</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>-0.84610</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>-0.54009</b> <b>0.0017</b>	<b>-0.41393</b> <b>0.0206</b>	-0.02405 0.8961	<b>0.55744</b> <b>0.0009</b>	<b>0.56877</b> <b>0.0007</b>	<b>-0.55135</b> <b>0.0011</b>
<b>Vigor</b>	<b>-0.70469</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>-0.39618</b> <b>0.0248</b>	<b>-0.38049</b> <b>0.0417</b>	-0.01167 0.9494	<b>0.43764</b> <b>0.0122</b>	<b>-0.43740</b> <b>0.0123</b>	<b>0.67253</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>-0.62951</b> <b>0.0002</b>	<b>-0.46365</b> <b>0.0086</b>	<b>-0.29177</b> <b>0.1112</b>	-0.06218 0.7353	<b>0.66807</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>0.64856</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>-0.53769</b> <b>0.0015</b>
<b>Integros E/N</b>	<b>-0.47478</b> <b>0.0052</b>	-0.32312 0.0666	-0.33045 0.0745	-0.12918 0.4737	<b>0.36582</b> <b>0.0363</b>	<b>-0.35795</b> <b>0.0408</b>	<b>0.75689</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>-0.74606</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>-0.50929</b> <b>0.0029</b>	<b>-0.29321</b> <b>0.1034</b>	0.03539 0.8450	0.26139 0.1417	0.29962 0.0903	<b>-0.35087</b> <b>0.0453</b>
<b>MOT</b>	<b>-0.91344</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>-0.47067</b> <b>0.0066</b>	<b>-0.48341</b> <b>0.0079</b>	-0.16007 0.3815	<b>0.38903</b> <b>0.0278</b>	<b>-0.38065</b> <b>0.0316</b>	<b>0.81488</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>-0.74183</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>-0.53312</b> <b>0.0020</b>	<b>-0.41099</b> <b>0.0216</b>	-0.11406 0.5342	<b>0.47720</b> <b>0.0058</b>	<b>0.49377</b> <b>0.0041</b>	<b>-0.47420</b> <b>0.0061</b>
<b>PROG</b>	<b>-0.79238</b> <b>&lt;.0001</b>	-0.31397 0.0801	-0.32934 0.0811	-0.30541 0.0892	0.17143 0.3482	-0.15127 0.4085	<b>0.66463</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>-0.58353</b> <b>0.0007</b>	<b>-0.50767</b> <b>0.0036</b>	<b>-0.36051</b> <b>0.0463</b>	-0.08027 0.6623	<b>0.43314</b> <b>0.0133</b>	<b>0.43388</b> <b>0.0131</b>	<b>-0.45016</b> <b>0.0097</b>
<b>VAP</b>	<b>-0.65342</b> <b>&lt;.0001</b>	-0.29362 0.1029	<b>-0.40775</b> <b>0.0281</b>	<b>-0.40452</b> <b>0.0217</b>	0.13146 0.4733	-0.10311 0.5744	<b>0.63741</b> <b>0.0002</b>	<b>-0.60294</b> <b>0.0004</b>	<b>-0.39474</b> <b>0.0280</b>	<b>-0.25650</b> <b>0.1637</b>	-0.11509 0.5305	0.26566 0.1417	0.26034 0.1501	-0.17545 0.3368
<b>VSL</b>	<b>-0.60164</b> <b>0.0003</b>	-0.19414 0.2870	-0.30083 0.1128	<b>-0.45015</b> <b>0.0097</b>	-0.00272 0.9882	0.03224 0.8609	<b>0.54613</b> <b>0.0018</b>	<b>-0.50614</b> <b>0.0043</b>	<b>-0.37864</b> <b>0.0357</b>	<b>-0.23014</b> <b>0.2129</b>	-0.09402 0.6088	0.21517 0.2369	0.19993 0.2726	-0.14005 0.4446
<b>VCL</b>	<b>-0.44448</b> <b>0.0122</b>	<b>-0.43320</b> <b>0.0149</b>	<b>-0.68109</b> <b>&lt;.0001</b>	-0.17047 0.3592	<b>0.49164</b> <b>0.0050</b>	<b>-0.46765</b> <b>0.0080</b>	<b>0.69425</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>-0.67546</b> <b>&lt;.0001</b>	-0.32769 0.0771	-0.27969 0.1344	-0.07696 0.6807	0.35401 0.0507	0.36453 0.0438	-0.22400 0.2257
<b>ALH</b>	0.08546 0.6476	-0.22140 0.2313	<b>-0.46657</b> <b>0.0123</b>	0.12880 0.4899	0.35386 0.0508	-0.35091 0.0529	0.12512 0.5178	-0.19564 0.3091	0.13876 0.4646	0.07129 0.7082	0.03383 0.8566	0.05547 0.7669	0.09812 0.5995	-0.06129 0.7433
<b>BCF</b>	-0.00870 0.9623	0.04295 0.8154	0.16794 0.3838	<b>0.54377</b> <b>0.0013</b>	0.16458 0.3680	-0.17405 0.3407	-0.15551 0.4119	0.08920 0.6393	0.13031 0.4847	0.14974 0.4214	0.16612 0.3635	-0.22314 0.2196	-0.19279 0.2904	0.00164 0.9929
<b>STR</b>	-0.33585 0.0602	0.01829 0.9208	0.12032 0.5341	<b>-0.42309</b> <b>0.0158</b>	-0.33892 0.0578	<b>0.35424</b> <b>0.0467</b>	0.16507 0.3834	-0.13632 0.4726	-0.19494 0.2933	-0.07524 0.6875	-0.11872 0.5175	0.12190 0.5063	0.08724 0.6349	-0.02008 0.9131
<b>Rápido</b>	<b>-0.84818</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>-0.44115</b> <b>0.0115</b>	<b>-0.39106</b> <b>0.0359</b>	-0.26804 0.1380	0.29358 0.1029	-0.27940 0.1215	<b>0.74867</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>-0.66562</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>-0.49027</b> <b>0.0051</b>	<b>-0.39402</b> <b>0.0283</b>	-0.14147 0.4399	0.49920 0.0036	0.50993 0.0029	<b>-0.46955</b> <b>0.0067</b>
<b>Médio</b>	<b>-0.48370</b> <b>0.0050</b>	-0.23199 0.2014	<b>-0.43386</b> <b>0.0187</b>	0.28628 0.1122	<b>0.41518</b> <b>0.0181</b>	<b>-0.43056</b> <b>0.0139</b>	<b>0.41119</b> <b>0.0240</b>	<b>-0.41929</b> <b>0.0211</b>	-0.27597 0.1329	-0.17527 0.3456	0.05403 0.7690	0.07759 0.6729	0.10098 0.5824	-0.16055 0.3800
<b>Lento</b>	<b>-0.44122</b> <b>0.0102</b>	-0.05445 0.7635	-0.17396 0.3579	0.12185 0.4993	0.06117 0.7352	-0.02931 0.8714	0.13080 -0.66562	-0.15258 0.4125	-0.09749 0.5955	-0.01990 0.9139	0.27130 0.1267	-0.04910 0.7861	-0.04912 0.7861	-0.18151 0.3120

Tabela 16 - Coeficientes de correlação e significância das variáveis obtidas na avaliação seminal do grupo GSH20 - São Paulo – 2012

	Estático	TB Ind	TB Esp	Fragm	JC1 elev	JC1 baixo	DAB I	DAB II	DAB III	DAB IV	FITC MI	FITC MA	FITC MP	FITC MPA
<b>Estático</b>	1.00000	0.39797 0.0218	0.43415 0.0165	0.05721 0.7518	-0.40002 0.0211	0.38204 0.0282	-0.72945 <.0001	0.66914 <.0001	0.50662 0.0031	0.39435 0.0255	-0.11952 0.5076	-0.38441 0.0272	-0.39518 0.0228	0.56635 0.0006
<b>TB Ind</b>		1.00000	0.23107 0.2192	-0.07542 0.6766	-0.43978 0.0104	0.45445 0.0079	-0.48887 0.0053	0.49422 0.0047	0.28184 0.1386	0.31764 0.0765	0.39772 0.0219	-0.51677 0.0021	-0.58449 0.0004	0.30533 0.0840
<b>TB Esp</b>			1.00000	0.23918 0.2030	-0.38241 0.0370	0.35304 0.0557	-0.59180 0.0007	0.53792 0.0026	0.43521 0.0183	0.017830 0.9229	-0.17884 0.3444	-0.19458 0.3028	-0.19901 0.2917	0.28835 0.1223
<b>Fragm</b>				1.00000	0.27633 0.1195	-0.29325 0.0977	-0.11456 0.5394	0.10238 0.5837	0.02919 0.8740	-0.07133 0.6980	-0.08613 0.6336	-0.03666 0.8395	0.01950 0.9142	-0.03450 0.8488
<b>JC1 elev</b>					1.00000	-0.99535 <.0001	0.63764 0.0001	-0.60001 0.0004	-0.51234 0.0027	0.50835 0.0030	0.05648 0.7549	0.22842 0.2010	0.29290 0.0981	-0.28348 0.1099
<b>JC1 baixo</b>						1.00000	-0.62588 0.0002	0.58753 0.0005	-0.16877 0.3558	0.18203 0.3187	0.07747 0.6683	-0.22814 0.2016	-0.29370 0.0971	0.26734 0.1326
<b>DAB I</b>							1.00000	-0.94062 <.0001	-0.74661 <.0001	-0.52560 0.0024	-0.03630 0.8463	-0.34896 0.0543	0.43399 0.0147	-0.43385 0.0148
<b>DAB II</b>								1.00000	0.55651 0.0011	0.29838 0.1030	-0.04877 0.7945	-0.29304 0.1096	0.40315 0.0245	0.47353 0.0071
<b>DAB III</b>									1.00000	0.33914 0.0576	0.01441 0.9376	-0.20373 0.2634	-0.18667 0.3063	0.11279 0.5388
<b>DAB IV</b>										1.00000	0.28049 0.1200	-0.42508 0.0153	-0.39131 0.0268	0.15046 0.4111
<b>FITC MI</b>											1.00000	-0.37742 0.0304	-0.42448 0.0138	-0.31927 0.0701
<b>FITC MA</b>												1.00000	0.98210 <.0001	-0.60086 0.0002
<b>FITC MP</b>													1.00000	-0.63195 <.0001
<b>FITC MPA</b>														1.00000

#### 6.1.4 Comparação das Variáveis Seminais entre os Grupos Experimentais ou Concentração de Glutathiona Reduzida (GSH0, GSH10 e GSH20) nas Amostras Pós-Descongelção

Apenas as amostras descongeladas foram avaliadas nos diferentes grupos separadamente (GSH0, GSH10 e GSH20), conforme resultados apresentados nas tabelas 17 a 21. Houve um decréscimo significativo da motilidade espermática subjetiva conforme a maior suplementação de glutathiona (GSH0: 45,0 %  $\pm$  5,8; GSH10: 28,6 %  $\pm$  5,7; GSH20: 11,0 %  $\pm$  2,6; Tabela 17). Por outro lado, o vigor espermático reduziu significativamente no grupo GSH20, em relação ao controle (GSH20: 1,5  $\pm$  0,2 e GSH0: 2,3  $\pm$  0,3; Tabela 17).

Tabela 17 – Média e desvio padrão da motilidade espermática subjetiva e vigor espermático dos grupos GSH0, GSH10 e GSH20 após descongelção - São Paulo - 2012

	GSH0	GSH10	GSH20
MOTILIDADE (%)	45,0 $\pm$ 5,8 <sup>a</sup>	28,6 $\pm$ 5,7 <sup>b</sup>	11,0 $\pm$ 2,6 <sup>c</sup>
VIGOR	2,3 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	2,0 $\pm$ 0,2 <sup>ab</sup>	1,5 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c</sup>: Letras diferentes indicam diferenças significativas dentro das linhas (p<0.05)

Na avaliação computadorizada da motilidade (CASA), o grupo GSH20 apresentou menor motilidade total e progressiva, bem como porcentagem de espermatozóides com velocidade de deslocamento rápido e médio, em relação aos demais grupos (GSH0 e GSH10; tabela 18). Ainda, a porcentagem espermatozóides estáticos foi superior no grupo GSH20 (72,2 %  $\pm$  7,5), em comparação ao controle (53,3 %  $\pm$  5,2; tabela 18). Já as velocidades de deslocamento dos espermatozóides (VAP e VCL) foram estatisticamente inferiores tanto no grupo GSH10, como no grupo GSH20, em relação ao controle, conforme ilustrado na tabela 18.

Tabela 18 – Média e desvio padrão das variáveis da análise computadorizada da motilidade (CASA) dos grupos GSH0, GSH10 e GSH20 após descongelação - São Paulo - 2012

	GSH0	GSH10	GSH20
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	77,3 $\pm$ 3,6 <sup>a</sup>	66,2 $\pm$ 4,7 <sup>b</sup>	59,2 $\pm$ 2,3 <sup>b</sup>
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	63,8 $\pm$ 5,1 <sup>a</sup>	56,3 $\pm$ 5,4 <sup>ab</sup>	49,7 $\pm$ 2,7 <sup>b</sup>
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	132,4 $\pm$ 3,9 <sup>a</sup>	109,1 $\pm$ 4,9 <sup>b</sup>	101,4 $\pm$ 5,1 <sup>b</sup>
ALH ( $\mu\text{m}$ )	6,9 $\pm$ 0,3	6,2 $\pm$ 0,5	5,9 $\pm$ 0,5
BCF (Hz)	31,1 $\pm$ 0,7	32,6 $\pm$ 1,1	32,0 $\pm$ 0,9
STR (%)	75,8 $\pm$ 3,3	77,7 $\pm$ 3,2	76,3 $\pm$ 2,2
LIN (%)	47,0 $\pm$ 3,6	49,5 $\pm$ 3,3	47,1 $\pm$ 2,7
MOT (%)	28,2 $\pm$ 3,0 <sup>a</sup>	21,6 $\pm$ 3,3 <sup>a</sup>	11,4 $\pm$ 2,2 <sup>b</sup>
PROGR (%)	16,5 $\pm$ 2,5 <sup>a</sup>	13,2 $\pm$ 2,8 <sup>a</sup>	6,0 $\pm$ 1,3 <sup>b</sup>
RAPID (%)	20,1 $\pm$ 2,3 <sup>a</sup>	14,3 $\pm$ 2,8 <sup>a</sup>	6,2 $\pm$ 1,4 <sup>b</sup>
MEDIUM (%)	8,0 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>	7,5 $\pm$ 0,8 <sup>ab</sup>	5,2 $\pm$ 1,0 <sup>b</sup>
SLOW (%)	18,6 $\pm$ 3,6	22,5 $\pm$ 5,3	17,3 $\pm$ 6,0
STATIC (%)	53,3 $\pm$ 5,2 <sup>b</sup>	55,6 $\pm$ 5,3 <sup>ab</sup>	72,2 $\pm$ 7,5 <sup>a</sup>

<sup>a,b,c</sup>: Letras diferentes indicam diferenças significativas dentro das linhas ( $p < 0.05$ )

Os grupos tratados com glutatona apresentaram menor porcentagem de lesão acrossomal (FITC/PI MA), comparando-se ao controle (Tabela 19). Para as demais análises de lesão de membrana, não houve diferença estatística entre os grupos (Tabela 19).

Tabela 19 – Média e desvio padrão da porcentagem de espermatozóides com membrana íntegra avaliada pela técnica da Eosina-Nigrosina e por citometria de fluxo das sondas FITC/PI (integridade de membranas) e SCSA (fragmentação de DNA) dos grupos GSH0, GSH10 e GSH20 após descongelação - São Paulo - 2012

	GSH0	GSH10	GSH20
VIVOS E/N (%)	44,0 $\pm$ 8,8	42,3 $\pm$ 8,9	36,4 $\pm$ 8,5
FITC/PI MI (%)	29,5 $\pm$ 4,4	36,8 $\pm$ 3,4	37,5 $\pm$ 4,6
FITC/PI MP (%)	13,8 $\pm$ 5,5	15,5 $\pm$ 2,3	16,8 $\pm$ 1,7
FITC/PI MA (%)	25,0 $\pm$ 5,5 <sup>a</sup>	13,6 $\pm$ 2,3 <sup>b</sup>	13,1 $\pm$ 1,5 <sup>b</sup>
FITC/PI MPA (%)	31,7 $\pm$ 4,0	34,2 $\pm$ 4,0	32,6 $\pm$ 4,2
SCSA – Fragmentação de DNA	1,90 $\pm$ 0,17	3,31 $\pm$ 0,67	2,76 $\pm$ 0,47

<sup>a,b,c</sup>: Letras diferentes indicam diferenças significativas dentro das linhas ( $p < 0.05$ )

FITC/PI MI – membranas plasmática e acrossomal íntegras

FITC/PI MP - membrana plasmática lesada

FITC/PI MA – membrana acrossomal lesada

FITC/PI MPA - membranas plasmática e acrossomal lesadas

Em relação à atividade mitocondrial, o grupo GSH20 apresentou maior porcentagem de espermatozóides com baixa atividade, em comparação ao grupo controle, porém não diferiu do grupo GSH10 (Tabela 20). Para a análise do estresse oxidativo (TBARS), não foram verificadas diferenças significativas entre os grupos experimentais nas amostras pós-descongelação (Tabela 21).

Tabela 20 – Média e desvio padrão da atividade mitocondrial por oxidação da 3,3'-diaminobenzidina (DAB) e por avaliação da sonda JC1 dos grupos GSH0, GSH10 e GSH20 após descongelamento - São Paulo – 2012

	GSH0	GSH10	GSH20
DAB I (%)	39,4 ±5,0	29,8 ±5,3	32,5 ±3,9
DAB II (%)	50,6 ±3,7	54,7 ±4,6	47,7 ±3,1
DAB III (%)	8,1 ±1,8 <sup>b</sup>	9,3 ±2,2 <sup>ab</sup>	14,1 ±1,5 <sup>a</sup>
DAB IV (%)	1,9 ±0,4	6,2 ±3,3	5,6 ±1,5
JC1 ELEVADO (%)	14,2 ±1,5	19,9 ±3,2	17,2 ±4,2
JC1 BAIXO (%)	85,8 ±1,5	80,1 ±3,2	82,8 ±4,2

<sup>a,b,c</sup>: Letras diferentes indicam diferenças significativas dentro das linhas (p<0.05)

Tabela 21 – Média e desvio padrão da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) espontâneo e induzido dos grupos GSH0, GSH10 e GSH20 após descongelamento - São Paulo – 2012

	GSH0	GSH10	GSH20
TBARS ESPONTÂNEO (ng/mL)	4771,2 ±539,4	4570,2 ±637,8	5104,1 ±606,4
TBARS INDUZIDO (ng/10 <sup>6</sup> sptz)	569,3 ±57,2	647,9 ±92,0	611,0 ±18,5

<sup>a,b,c</sup>: Letras diferentes indicam diferenças significativas dentro das linhas (p<0.05)

### 6.1.5 Comparação entre as Etapas de Criopreservação Seminal (Refrigeração, Glicerolização e Pós-Descongelamento)

O efeito do tempo durante o procedimento de criopreservação está ilustrado nas tabelas 22, 23, 24, 25 e 26.

A exposição dos espermatozoides ao nitrogênio líquido durante o processo de criopreservação e posterior descongelamento promoveu queda significativa do vigor espermático e menor porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva subjetiva, comparando-se aos demais momentos de análise (refrigeração e glicerolização, Tabela 22).

Tabela 22 – Média e desvio padrão da motilidade espermática subjetiva e vigor espermático após refrigeração, glicerolização e descongelamento - São Paulo - 2012

	REFRIGERAÇÃO	GLICEROLIZAÇÃO	DESCONGELAMENTO
MOTILIDADE (%)	61,8 ±3,2 <sup>a</sup>	58,2 ±3,1 <sup>a</sup>	28,8 ±3,7 <sup>b</sup>
VIGOR	2,8 ±0,1 <sup>a</sup>	2,8 ±0,1 <sup>a</sup>	1,9 ±0,1 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c</sup>: Letras diferentes indicam diferenças significativas dentro das linhas (p<0.05)

É possível notar que a descongelção interfere negativamente nas velocidades de deslocamento dos espermatozoides (VAP e VSL), bem como na porcentagem de espermatozoides com movimento progressivo e rápido (Tabela 23). Ainda, não houve diferença estatística entre as amostras refrigeradas e glicerolizadas para tais variáveis (Tabela 23).

Por outro lado, observa-se influência negativa da glicerolização na velocidade de deslocamento curvilíneo (VCL), amplitude do movimento lateral da cabeça (ALH), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF), porcentagem de espermatozoides móveis (MOT) e velocidade de deslocamento médio (MED), quando comparado às amostras refrigeradas (Tabelas 23). Para a porcentagem de espermatozoides estáticos (STAT), houve aumento significativo e progressivo ao longo do processo de criopreservação (refrigeração: 18,8 %  $\pm$  2,5; glicerolização: 28,4 %  $\pm$  3,3 e pós-descongelção: 60,4 %  $\pm$  3,7; Tabela 23).

Tabela 23 – Média e desvio padrão das variáveis seminais por análise computadorizada da motilidade (CASA) após refrigeração, glicerolização e descongelção - São Paulo – 2012

	REFRIGERAÇÃO	GLICEROLIZAÇÃO	DESCONGELAÇÃO
VAP ( $\mu\text{m/s}$ )	98,4 $\pm$ 4,5 <sup>a</sup>	91,7 $\pm$ 3,4 <sup>a</sup>	67,8 $\pm$ 2,5 <sup>b</sup>
VSL ( $\mu\text{m/s}$ )	79,2 $\pm$ 4,7 <sup>a</sup>	78,7 $\pm$ 3,8 <sup>a</sup>	56,8 $\pm$ 2,8 <sup>b</sup>
VCL ( $\mu\text{m/s}$ )	160,8 $\pm$ 5,1 <sup>a</sup>	146,0 $\pm$ 4,4 <sup>b</sup>	114,7 $\pm$ 3,5 <sup>c</sup>
ALH ( $\mu\text{m}$ )	7,9 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	7,1 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	6,3 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>
BCF (Hz)	29,7 $\pm$ 1,2 <sup>ab</sup>	27,4 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>	31,9 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>
STR (%)	73,5 $\pm$ 1,9 <sup>b</sup>	80,0 $\pm$ 1,9 <sup>a</sup>	76,6 $\pm$ 1,7 <sup>ab</sup>
LIN (%)	47,9 $\pm$ 2,9	54,0 $\pm$ 2,7	47,9 $\pm$ 1,8
MOT (%)	68,9 $\pm$ 3,3 <sup>a</sup>	58,8 $\pm$ 3,3 <sup>b</sup>	20,7 $\pm$ 2,0 <sup>c</sup>
PROGR (%)	41,4 $\pm$ 3,8 <sup>a</sup>	43,1 $\pm$ 3,2 <sup>a</sup>	12,1 $\pm$ 1,5 <sup>b</sup>
RAPID (%)	54,3 $\pm$ 4,0 <sup>a</sup>	49,4 $\pm$ 3,3 <sup>a</sup>	13,8 $\pm$ 1,6 <sup>b</sup>
MEDIUM (%)	14,6 $\pm$ 1,3 <sup>a</sup>	9,2 $\pm$ 1,2 <sup>b</sup>	6,9 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>
SLOW (%)	12,3 $\pm$ 1,6	12,9 $\pm$ 0,9	19,5 $\pm$ 2,9
STATIC (%)	18,8 $\pm$ 2,5 <sup>c</sup>	28,4 $\pm$ 3,3 <sup>b</sup>	60,4 $\pm$ 3,7 <sup>a</sup>

<sup>a,b,c</sup>: Letras diferentes indicam diferenças significativas dentro das linhas ( $p < 0,05$ )

Em relação à integridade das membranas espermáticas, nota-se estatisticamente menor porcentagem de espermatozoides com membrana íntegra na avaliação pela Eosina-Nigrosina e, maior porcentagem de lesão da membrana plasmática e acrossomal após a descongelção (Tabela 24). Por outro lado, não houve influência da glicerolização sobre tais variáveis seminais, em comparação à refrigeração (Tabela 24).



Tabela 24 – Média e desvio padrão da porcentagem de espermatozóides com membrana plasmática íntegra analisada pela técnica da Eosina-Nigrosina e por avaliação das sondas FITC/PI (integridade de membranas) e SCSA (fragmentação do DNA) por citometria de fluxo após refrigeração, glicerolização e descongelamento. São Paulo - 2012

	REFRIGERAÇÃO	GLICEROLIZAÇÃO	DESCONGELAMENTO
Íntegros E/N (%)	65,7 ±3,6 <sup>a</sup>	67,1 ±2,8 <sup>a</sup>	40,9 ±4,9 <sup>b</sup>
FITC/PI MI (%)	33,3 ±2,5	36,9 ±2,1	34,6 ±2,4
FITC/PI MP (%)	11,2 ±1,3 <sup>a</sup>	11,1 ±1,1 <sup>a</sup>	13,8 ±1,3 <sup>b</sup>
FITC/PI MA (%)	35,4 ±4,2 <sup>a</sup>	32,1 ±2,8 <sup>a</sup>	17,2 ±2,2 <sup>b</sup>
FITC/PI MPA (%)	20,1 ±2,1 <sup>b</sup>	20,0 ±1,9 <sup>b</sup>	32,8 ±2,3 <sup>a</sup>
SCSA - Fragmentação DNA(%)	3,09 ±1,8 <sup>ab</sup>	3,97 ±3,1 <sup>a</sup>	2,69 ±1,7 <sup>b</sup>

<sup>a,b,c</sup>: Letras diferentes indicam diferenças significativas dentro das linhas (p<0.05)

FITC/PI MI – membranas plasmática e acrossomal íntegras

FITC/PI MP - membrana plasmática lesada

FITC/PI MA – membrana acrossomal lesada

FITC/PI MPA - membranas plasmática e acrossomal lesadas

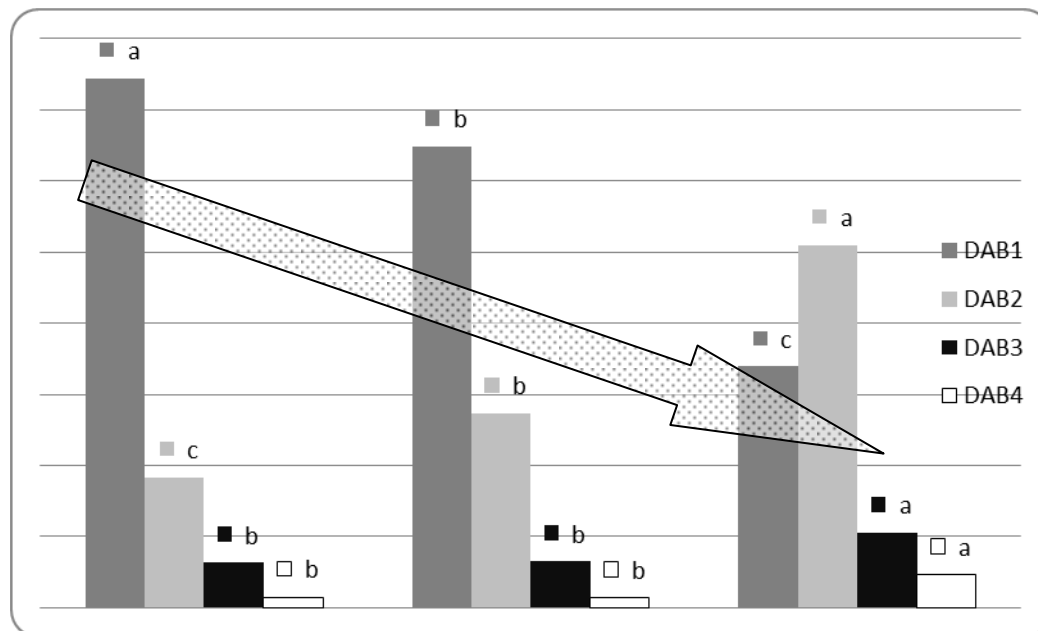
Além da influência na integridade de membrana, o procedimento de descongelamento das amostras foi capaz de diminuir significativamente a atividade mitocondrial e o potencial de membrana mitocondrial dos espermatozóides, quando comparado à refrigeração e glicerolização (Tabela 25). Todavia, a adição do glicerol durante a criopreservação reduziu significativamente a porcentagem de espermatozóides com alta e média atividade mitocondrial (DAB I e II), em relação às amostras refrigeradas (Figura 7 e Tabela 25).

Tabela 25 – Média e desvio padrão da atividade mitocondrial por oxidação da 3,3'-diaminobenzidina (DAB) e por avaliação da sonda JC1 após refrigeração, glicerolização e descongelamento - São Paulo - 2012

	REFRIGERAÇÃO	GLICEROLIZAÇÃO	DESCONGELAMENTO
DAB I (%)	74,4 ±2,2 <sup>a</sup>	64,8 ±2,6 <sup>b</sup>	33,9 ±2,8 <sup>c</sup>
DAB II (%)	18,3 ±1,8 <sup>c</sup>	27,3 ±2,2 <sup>b</sup>	51,0 ±2,2 <sup>a</sup>
DAB III (%)	6,3 ±0,9 <sup>b</sup>	6,5 ±0,8 <sup>b</sup>	10,5 ±1,1 <sup>a</sup>
DAB IV (%)	1,5 ±0,5 <sup>b</sup>	1,4 ±0,4 <sup>b</sup>	4,6 ±1,2 <sup>a</sup>
JC1 ELEVADO (%)	45,0 ±3,2 <sup>a</sup>	37,9 ±2,5 <sup>a</sup>	17,1 ±1,8 <sup>b</sup>
JC1 BAIXO (%)	55,0 ±3,2 <sup>b</sup>	62,1 ±2,5 <sup>b</sup>	82,9 ±1,8 <sup>a</sup>

<sup>a,b,c</sup>: Letras diferentes indicam diferenças significativas dentro das linhas (p<0.05)

Figura 7 – Atividade mitocondrial por oxidação da 3,3'-diaminobenzidina (DAB) em relação ao tempo (refrigeração, glicerolização e descongelamento)



a, b, c - Diferença estatística entre os momentos avaliados ( $p < 0,05$ )

A concentração de TBARS espontâneo apresentou valores significativos e crescentes durante os procedimentos da criopreservação ( $87,4 \text{ ng/mL} \pm 15,5$ ;  $1226,3 \text{ ng/mL} \pm 256,0$  e  $4815,2 \text{ ng/mL} \pm 335,4$  respectivamente para a refrigeração, glicerolização e descongelamento), enquanto o TBARS induzido apresentou aumento significativo apenas após a descongelamento (Tabela 26).

Tabela 26 – Média e desvio padrão da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) espontâneo e induzido após refrigeração, glicerolização e descongelamento - São Paulo – 2012

	REFRIGERAÇÃO	GLICEROLIZAÇÃO	DESCONGELAÇÃO
TBARS ESPONTÂNEO (ng/mL)	$87,4 \pm 15,5^c$	$1226,3 \pm 256,0^b$	$4815,2 \pm 335,4^a$
TBARS INDUZIDO (ng/10 <sup>6</sup> sptz)	$411,4 \pm 23,8^b$	$448,7 \pm 23,6^b$	$609,4 \pm 35,9^a$

<sup>a,b,c</sup>: Letras diferentes indicam diferenças significativas dentro das linhas ( $p < 0,05$ )

Para a análise de correlação das variáveis nos diferentes momentos de avaliação, verifica-se que a porcentagem de espermatozoides estáticos correlacionou *positivamente* com a atividade mitocondrial elevada (JC1 elevada;  $r = 0,35$ ,  $p = 0,04$ ), com a lesão de membrana

plasmática (FITC/PI MP;  $r= 0,36$ ,  $p= 0,03$ ) e com o batimento flagelar cruzado (BCF;  $r= 0,64$ ,  $p<0,0001$ ) durante a refrigeração (Tabela 27). Após a glicerolização e a descongelação, a motilidade espermática subjetiva correlacionou *positivamente* com a alta atividade mitocondrial (DAB I;  $r= 0,64$ ,  $p= 0,0001$ ;  $r= 0,40$ ,  $p= 0,02$ , respectivamente para os referidos momentos; Tabelas 28 e 29). Apenas espermatozóides descongelados apresentaram correlação *positiva* entre a porcentagem de lesão da membrana plasmática (FITC/PI MP) ou acrossomal (FITC/PI MA) e as porcentagens de espermatozóides rápidos ( $r= 0,38$ ,  $p= 0,02$ ;  $r= 0,41$ ,  $p= 0,01$ , respectivamente), com motilidade total ( $r= 0,43$ ,  $p= 0,01$ ;  $p= 0,45$ ,  $p= 0,0008$ , respectivamente) e com a motilidade espermática subjetiva ( $r= 0,41$ ,  $p= 0,01$ ;  $p= 0,47$ ,  $r= 0,005$ , respectivamente; Tabela 29). Ainda, após a descongelação, houve correlação *positiva* entre a porcentagem de espermatozóides estáticos e o estresse oxidativo (TBARS espontâneo;  $r= 0,37$ ,  $p= 0,03$ ) e com a lesão de membranas plasmática e acrossomal (FITC/PI MPA;  $r= 0,35$ ,  $p= 0,04$ ; Tabela 29).

Tabela 27 - Coeficientes de correlação e significância das variáveis obtidas na avaliação seminal das amostras refrigeradas - São Paulo – 2012

	Motilidade	Vigor	Íntegros E/N	MOT	PROG	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	Rápido	Médio	Lento
<b>Motilidade</b>	1.00000	<b>0.76830</b> <.0001	<b>0.57083</b> <b>0.0005</b>	0.31621 0.0730	<b>0.36626</b> <b>0.0361</b>	<b>0.40655</b> <b>0.0189</b>	<b>0.47704</b> <b>0.0050</b>	0.16409 0.3615	<b>-0.38641</b> <b>0.0263</b>	<b>-0.38561</b> <b>0.0267</b>	<b>0.63500</b> <.0001	0.33916 0.0535	-0.22472 0.2086	<b>-0.46240</b> <b>0.0067</b>
<b>Vigor</b>		1.00000	<b>0.50791</b> <b>0.0025</b>	0.29005 0.1015	0.33828 0.0542	0.26421 0.1373	<b>0.34619</b> <b>0.0484</b>	-0.02769 0.8784	<b>-0.39543</b> <b>0.0227</b>	-0.28601 0.1066	<b>0.51616</b> <b>0.0021</b>	0.28893 0.1029	-0.15182 0.3990	-0.25964 0.1445
<b>Íntegros E/N</b>			1.00000	0.27365 0.1233	<b>0.48591</b> <b>0.0041</b>	0.26203 0.140	<b>0.40267</b> <b>0.0202</b>	-0.17016 0.3438	<b>-0.59076</b> <b>0.0003</b>	<b>-0.35997</b> <b>0.0396</b>	<b>0.59830</b> <b>0.0002</b>	0.29728 0.0929	-0.23076 0.1963	-0.04783 0.7915
<b>MOT</b>				1.00000	<b>0.81275</b> <.0001	<b>0.86020</b> <.0001	<b>0.77816</b> <.0001	<b>0.53557</b> <b>0.0013</b>	-0.19186 0.2848	<b>-0.72180</b> <.0001	<b>0.52187</b> <b>0.0018</b>	<b>0.95326</b> <.0001	<b>-0.37223</b> <b>0.0329</b>	<b>-0.60972</b> <b>0.0002</b>
<b>PROG</b>					1.00000	<b>0.84346</b> <.0001	<b>0.88038</b> <.0001	0.28224 0.1115	<b>-0.53593</b> <b>0.0013</b>	<b>-0.76935</b> <.0001	<b>0.76508</b> <.0001	<b>0.91253</b> <.0001	<b>-0.73349</b> <.0001	<b>-0.43077</b> <b>0.0123</b>
<b>VAP</b>						1.00000	<b>0.95889</b> <.0001	<b>0.57971</b> <b>0.0004</b>	-0.37136 0.0334	<b>-0.75869</b> <.0001	<b>0.70202</b> <.0001	<b>0.90209</b> <.0001	-0.57018 0.0005	-0.54955 0.0009
<b>VSL</b>							1.00000	<b>0.36343</b> <b>0.0376</b>	<b>-0.59004</b> <b>0.0003</b>	<b>-0.77178</b> <.0001	<b>0.85407</b> <.0001	<b>0.83980</b> <.0001	-0.59180 0.0003	-0.45592 0.0077
<b>VCL</b>								1.00000	<b>0.41364</b> <b>0.0167</b>	-0.17622 0.3266	0.04971 0.7835	<b>0.53036</b> <b>0.0015</b>	-0.24979 0.1609	<b>-0.60895</b> <b>0.0002</b>
<b>ALH</b>									1.00000	<b>0.44549</b> <b>0.0094</b>	<b>-0.78961</b> <.0001	-0.29512 0.0954	<b>0.42055</b> <b>0.0148</b>	0.03061 0.8657
<b>BCF</b>										1.00000	<b>-0.66309</b> <.0001	<b>-0.78951</b> <.0001	<b>0.58320</b> <b>0.0004</b>	<b>0.48506</b> <b>0.0042</b>
<b>STR</b>											1.00000	<b>0.61170</b> <b>0.0002</b>	<b>-0.54872</b> <b>0.0009</b>	<b>-0.41410</b> <b>0.0166</b>
<b>Rápido</b>												1.00000	<b>-0.63484</b> <.0001	<b>-0.63232</b> <.0001
<b>Médio</b>													1.00000	<b>0.37189</b> <b>0.0331</b>
<b>Lento</b>														1.00000

Tabela 27 - Coeficientes de correlação e significância das variáveis obtidas na avaliação seminal das amostras refrigeradas - São Paulo – 2012

	Estático	TB Ind	TB Esp	Fragm	JC1elev	JC1 baixo	DAB I	DAB II	DAB III	DAB IV	FITC MI	FITC MA	FITC MP	FITC MPA
<b>Motilidade</b>	-0.14853 0.4094	0.07389 0.6828	0.19828 0.3530	-0.12170 0.4999	0.06163 0.7333	-0.05162 0.7754	0.33666 0.0596	-0.27156 0.1327	-0.16442 0.3605	-0.13867 0.4415	-0.04885 0.7872	0.14533 0.4197	0.14509 0.4205	-0.23357 0.1908
<b>Vigor</b>	-0.25342 0.1547	-0.01411 0.9478	0.09112 0.6140	-0.14153 0.4321	-0.02962 0.8700	0.03378 0.8520	0.46363 0.0075	<b>-0.37868</b> <b>0.0326</b>	-0.18761 0.2958	-0.19070 0.2878	-0.07517 0.6776	0.31246 0.0767	0.25691 0.1489	-0.22031 0.2179
<b>Integros E/N</b>	-0.28434 0.1088	0.23699 0.1842	0.21385 0.3157	-0.05314 0.7690	0.10604 0.5570	-0.08239 0.6485	<b>0.36837</b> <b>0.0380</b>	<b>-0.47224</b> <b>0.0064</b>	-0.14083 0.4344	0.22644 0.2051	<b>0.42339</b> <b>0.0141</b>	-0.12044 0.5044	-0.13766 0.4449	-0.09271 0.6078
<b>MOT</b>	<b>-0.89829</b> <b>&lt;.0001</b>	-0.03530 0.8454	0.16655 0.4367	-0.34322 0.0505	-0.27603 0.1200	0.28158 0.1124	0.14309 0.4347	-0.09571 0.6023	0.10529 0.5598	-0.26737 0.1325	-0.00466 0.9795	-0.18980 0.2901	-0.20778 0.2459	0.20987 0.2411
<b>PROG</b>	<b>-0.74072</b> <b>&lt;.0001</b>	0.03886 0.8300	0.20381 0.3395	-0.34336 0.0504	-0.26188 0.1410	0.27590 0.1201	0.26353 0.1450	-0.21879 0.2290	0.01780 0.9217	-0.33365 0.0578	-0.01420 0.9375	0.02211 0.9028	-0.00251 0.9890	0.00306 0.9865
<b>VAP</b>	<b>-0.72055</b> <b>&lt;.0001</b>	0.08584 0.6348	0.12700 0.5543	<b>-0.38591</b> <b>0.0265</b>	<b>-0.36497</b> <b>0.0368</b>	<b>0.37262</b> <b>0.0327</b>	0.14334 0.4338	-0.06528 0.7226	0.00235 0.9897	-0.29643 0.0939	0.00929 0.959	-0.14301 0.4272	-0.17626 0.3265	0.15544 0.3877
<b>VSL</b>	<b>-0.65690</b> <b>&lt;.0001</b>	0.17091 0.3416	0.18730 0.3808	<b>-0.38787</b> <b>0.0257</b>	<b>-0.37269</b> <b>0.0327</b>	<b>0.38795</b> <b>0.0257</b>	0.19463 0.2858	-0.12057 0.5110	-0.03158 0.8615	-0.28794 0.1042	0.06553 0.7171	-0.11744 0.5151	-0.15179 0.3991	0.07856 0.6639
<b>VCL</b>	-0.29839 0.0917	-0.17161 0.3396	-0.24527 0.2480	-0.26287 0.1394	-0.02982 0.8691	0.00973 0.9571	0.11810 0.5197	-0.02225 0.9038	-0.03234 0.8582	-0.20903 0.2430	-0.14990 0.4051	-0.00432 0.9810	-0.02218 0.9025	0.13784 0.4443
<b>ALH</b>	0.21107 0.2384	-0.23605 0.1860	-0.31548 0.1332	0.16507 0.3586	0.23404 0.1899	-0.25754 0.1479	-0.22236 0.2212	0.21221 0.2436	0.06919 0.7020	0.11249 0.5331	-0.14820 0.4105	-0.05638 0.7553	-0.03705 0.8378	0.18306 0.3079
<b>BCF</b>	<b>0.64153</b> <b>&lt;.0001</b>	-0.01382 0.9392	<b>-0.49673</b> <b>0.0135</b>	0.34346 0.0504	0.33036 0.0604	<b>-0.35529</b> <b>0.0425</b>	-0.04358 0.8128	0.07732 0.6740	-0.18353 0.3066	0.16840 0.3489	0.06803 0.7068	0.03540 0.8449	0.03407 0.8507	-0.04161 0.8182
<b>STR</b>	<b>-0.37171</b> <b>0.0332</b>	0.22731 0.2033	0.29845 0.1566	<b>-0.39122</b> <b>0.0244</b>	-0.19094 0.2871	0.21517 0.2291	0.32543 0.0691	-0.26505 0.1426	-0.05901 0.7443	-0.28161 0.1124	0.03470 0.8480	0.05150 0.7759	0.03055 0.8660	-0.11629 0.5193
<b>Rápido</b>	<b>-0.83874</b> <b>&lt;.0001</b>	-0.06864 0.7043	0.16520 0.4404	<b>-0.37168</b> <b>0.0332</b>	-0.27419 0.1226	0.28252 0.1112	0.17900 0.3270	-0.11500 0.5308	0.10379 0.5654	<b>-0.35002</b> <b>0.0458</b>	-0.08666 0.6316	-0.02306 0.8986	-0.04102 0.8207	0.07804 0.6660
<b>Médio</b>	0.28608 0.1065	0.11014 0.5417	-0.06550 0.7611	0.27436 0.1223	0.14010 0.4368	-0.15179 0.3991	-0.18677 0.3061	0.11458 0.5323	-0.05521 0.7603	<b>0.39008</b> <b>0.0248</b>	0.24189 0.1750	<b>-0.41158</b> <b>0.0173</b>	<b>-0.39955</b> <b>0.0212</b>	0.28792 0.1042
<b>Lento</b>	0.27946 0.1152	0.23875 0.1809	-0.14647 0.4946	<b>0.35232</b> <b>0.0443</b>	0.02817 0.8763	-0.03320 0.8545	-0.20088 0.2703	0.06358 0.7295	-0.08927 0.6213	<b>0.38830</b> <b>0.0255</b>	<b>0.40075</b> <b>0.0208</b>	-0.28905 0.1028	-0.30532 0.0840	0.14941 0.4066

Tabela 27 - Coeficientes de correlação e significância das variáveis obtidas na avaliação seminal das amostras refrigeradas - São Paulo – 2012

	Estático	TB Ind	TB Esp	Fragm	JC1 elev	JC1 baixo	DAB I	DAB II	DAB III	DAB IV	FITC MI	FITC MA	FITC MP	FITC MPA
<b>Estático</b>	1.00000	-0.07468 0.6796	-0.15176 0.4790	0.22077 0.2170	<b>0.35882</b> <b>0.0403</b>	<b>-0.36670</b> <b>0.0358</b>	-0.00847 0.9633	-0.01122 0.9514	-0.08336 0.6446	0.17688 0.3248	-0.16892 0.3474	0.33090 0.0600	<b>0.36806</b> <b>0.0351</b>	-0.31971 0.0697
<b>TB Ind</b>		1.00000	-0.06745 0.7542	-0.19593 0.2745	-0.30618 0.0831	0.31650 0.0727	-0.18211 0.3185	0.15260 0.4044	-0.11194 0.5351	0.10289 0.5688	<b>0.53514</b> <b>0.0013</b>	<b>-0.42433</b> <b>0.0138</b>	<b>-0.47898</b> <b>0.0048</b>	0.18137 0.3124
<b>TB Esp</b>			1.00000	-0.20994 0.3248	-0.08211 0.7029	0.09294 0.6658	-0.23636 -0.23636	-0.08888 0.6796	<b>0.54733</b> <b>0.0056</b>	0.24871 0.2412	-0.26714 0.2070	<b>-0.49712</b> <b>0.0135</b>	<b>-0.41171</b> <b>0.0456</b>	<b>0.51883</b> <b>0.0094</b>
<b>Fragm</b>				1.00000	<b>0.52770</b> <b>0.0016</b>	<b>-0.51501</b> <b>0.0022</b>	0.00396 0.9828	0.01202 0.9479	<b>-0.35589</b> <b>0.0421</b>	0.23248 0.1929	-0.05401 0.7653	0.03164 0.8612	0.04095 0.8210	-0.05401 0.7653
<b>JC1 elev</b>					1.00000	<b>-0.99777</b> <b>&lt;.0001</b>	0.12007 0.5128	-0.15983 0.3822	-0.15276 0.3961	0.24722 0.1654	-0.13243 0.4626	0.14106 0.4336	0.16987 0.3446	-0.07631 0.6730
<b>JC1 baixo</b>						1.00000	-0.11026 0.5480	0.15683 0.3914	0.13359 0.4586	-0.24165 0.1755	0.14405 0.4238	-0.14128 0.4329	-0.17177 0.3392	0.06930 0.7016
<b>DAB I</b>							1.00000	<b>-0.86997</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>-0.65977</b> <b>&lt;.0001</b>	-0.00354 0.9847	-0.05469 0.7662	<b>0.38346</b> <b>0.0303</b>	<b>0.37128</b> <b>0.0364</b>	-0.05469 0.7662
<b>DAB II</b>								1.00000	0.31720 0.0769	-0.29386 0.1026	-0.01606 0.9305	-0.14484 0.4290	-0.18425 0.3127	-0.01606 0.9305
<b>DAB III</b>									1.00000	-0.08164 0.6515	-0.19043 0.2885	-0.18695 0.2975	-0.10983 0.5429	0.23719 0.1838
<b>DAB IV</b>										1.00000	<b>0.44979</b> <b>0.0086</b>	<b>-0.46125</b> <b>0.0069</b>	<b>-0.41666</b> <b>0.0159</b>	0.14807 0.4109
<b>FITC MI</b>											1.00000	<b>-0.56317</b> <b>0.0006</b>	<b>-0.62702</b> <b>&lt;.0001</b>	0.08335 0.6447
<b>FITC MA</b>												1.00000	<b>0.98101</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>-0.71190</b> <b>&lt;.0001</b>
<b>FITC MP</b>													1.00000	<b>-0.74929</b> <b>&lt;.0001</b>
<b>FITC MPA</b>														1.00000

Tabela 28 - Coeficientes de correlação e significância das variáveis obtidas na avaliação seminal das amostras glicerolizadas - São Paulo – 2012

	Motilidade	Vigor	Íntegros E/N	MOT	PROG	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	Rápido	Médio	Lento
<b>Motilidade</b>	1.00000	0.63436 <.0001	0.50198 0.0029	0.50090 0.0030	0.50495 0.0027	0.44959 0.0087	0.53216 0.0014	-0.08408 0.6473	-0.45944 0.0082	-0.27280 0.1245	0.61024 0.0002	0.47368 0.0054	0.09836 0.5860	-0.02603 0.8857
<b>Vigor</b>		1.00000	0.54752 0.0010	0.51056 0.0024	0.43793 0.0108	0.44995 0.0086	0.49342 0.0035	-0.06970 0.7047	-0.39650 0.0247	-0.17539 0.3289	0.50639 0.0026	0.45233 0.0082	0.17585 0.3276	0.09171 0.6117
<b>Íntegros E/N</b>			1.00000	0.48100 0.0046	0.54039 0.0012	0.38580 0.0266	0.44853 0.0088	-0.12566 0.4932	-0.45884 0.0083	-0.02851 0.8749	0.50327 0.0028	0.48594 0.0041	0.01621 0.9287	0.08637 0.6327
<b>MOT</b>				1.00000	0.85379 <.0001	0.56656 0.0006	0.55065 0.0009	0.15715 0.3904	-0.28697 0.1113	-0.07925 0.6611	0.60347 0.0002	0.92860 <.0001	0.20351 0.2560	0.07044 0.6969
<b>PROG</b>					1.00000	0.72368 <.0001	0.74875 <.0001	0.14796 0.4190	-0.49355 0.0041	-0.41469 0.0164	0.77478 <.0001	0.97008 <.0001	-0.29094 0.1005	0.01407 0.9381
<b>VAP</b>						1.00000	0.97627 <.0001	0.50515 0.0032	-0.27696 0.1249	-0.50539 0.0027	0.82622 <.0001	0.71783 <.0001	-0.38271 0.0279	0.30811 0.0811
<b>VSL</b>							1.00000	0.29984 0.0955	-0.47300 0.0063	-0.56960 0.0005	0.91404 <.0001	0.70809 <.0001	-0.39733 0.0220	0.22888 0.2001
<b>VCL</b>								1.00000	0.59907 0.0003	-0.08999 0.6243	-0.06061 0.7417	0.25371 0.1612	-0.24830 0.1706	0.19893 0.2751
<b>ALH</b>									1.00000	0.38616 0.0290	-0.73685 <.0001	-0.38213 0.0309	0.26044 0.1500	0.37129 0.0364
<b>BCF</b>										1.00000	-0.53076 0.0015	-0.32652 0.0637	0.64256 <.0001	0.37675 0.0307
<b>STR</b>											1.00000	0.71264 <.0001	-0.26989 0.1288	0.12434 0.4906
<b>Rápido</b>												1.00000	-0.17362 0.3339	0.04220 0.8156
<b>Médio</b>													1.00000	0.07739 0.6686
<b>Lento</b>														1.00000

Tabela 28 - Coeficientes de correlação e significância das variáveis obtidas na avaliação seminal das amostras glicerolizadas - São Paulo – 2012

	Estático	TB Ind	TB Esp	Fragm	JC1elev	JC1 baixo	DAB I	DAB II	DAB III	DAB IV	FITC MI	FITC MA	FITC MP	FITC MPA
<b>Motilidade</b>	<b>-0.51833</b> <b>0.0020</b>	<b>0.34567</b> <b>0.0488</b>	0.21941 0.2199	-0.21453 0.2306	-0.16971 0.3451	0.16515 0.3584	<b>0.64792</b> <b>0.0001</b>	<b>-0.63474</b> <b>0.0002</b>	<b>-0.37071</b> <b>0.0437</b>	0.00230 0.9904	0.22253 0.2132	-0.07750 0.6682	-0.07694 0.6704	-0.30906 0.0801
<b>Vigor</b>	<b>-0.53855</b> <b>0.0012</b>	0.14468 0.4218	0.06547 0.7174	0.00457 0.9799	-0.07990 0.6585	0.07330 0.6852	0.28689 0.1243	-0.23704 0.2072	-0.32438 0.0803	0.13641 0.4723	-0.02876 0.8738	0.11131 0.5374	0.13075 0.4683	-0.19578 0.2749
<b>Integros E/N</b>	<b>-0.44721</b> <b>0.0091</b>	-0.08246 0.6482	0.17844 0.3204	-0.02464 0.8917	0.00172 0.9924	-0.00721 0.9682	<b>0.57417</b> <b>0.0009</b>	<b>-0.54703</b> <b>0.0018</b>	-0.28114 0.1323	-0.10542 0.5793	<b>0.04399</b> <b>0.04399</b>	0.20608 0.2499	0.23592 0.1863	<b>-0.40702</b> <b>0.0187</b>
<b>MOT</b>	<b>-0.96530</b> <b>&lt;.0001</b>	-0.07121 0.6937	0.21086 0.2388	-0.10581 0.5579	-0.11135 0.5373	0.10211 0.5718	0.29705 0.1109	-0.26299 0.1603	-0.26138 0.1630	-0.07149 0.7073	-0.14935 0.4068	0.31165 0.0775	0.32041 0.0691	-0.27122 0.1268
<b>PROG</b>	<b>-0.80267</b> <b>&lt;.0001</b>	0.02957 0.8702	0.20500 0.2524	<b>-0.35208</b> <b>0.0445</b>	-0.27354 0.1235	0.26622 0.1343	0.35147 0.0568	<b>-0.36799</b> <b>0.0454</b>	-0.17619 0.3517	0.05543 0.7711	-0.18403 0.3053	0.31842 0.0709	0.33438 0.0572	-0.27826 0.1169
<b>VAP</b>	<b>-0.49101</b> <b>0.0037</b>	0.16928 0.3463	-0.02482 0.8910	<b>-0.49651</b> <b>0.0033</b>	<b>-0.56505</b> <b>0.0006</b>	<b>0.55981</b> <b>0.0007</b>	0.24466 0.1926	-0.30249 0.1042	-0.08519 0.6544	0.27527 0.1409	<b>-0.34567</b> <b>0.0488</b>	-0.06556 0.7170	-0.03075 0.8651	0.17882 0.3194
<b>VSL</b>	<b>-0.47239</b> <b>0.0055</b>	0.24618 0.1673	0.00112 0.9951	<b>-0.53701</b> <b>0.0013</b>	<b>-0.57316</b> <b>0.0005</b>	<b>0.56814</b> <b>0.0006</b>	0.35140 0.0569	<b>-0.40529</b> <b>0.0263</b>	-0.17838 0.3456	0.32792 0.0769	-0.28606 0.1066	-0.05982 0.7409	-0.02244 0.9014	0.09361 0.6044
<b>VCL</b>	-0.10729 0.5589	-0.13313 0.4676	-0.17177 0.3472	-0.14782 0.4194	-0.20344 0.2641	0.20289 0.2654	-0.29729 0.1173	0.26209 0.1696	0.34491 0.0669	-0.04391 0.8211	-0.33255 0.0629	-0.07911 0.6669	-0.08894 0.6283	<b>0.43646</b> <b>0.0125</b>
<b>ALH</b>	0.23523 0.1950	-0.28204 0.1178	-0.30129 0.0938	0.37291 0.0355	0.17595 0.3354	-0.17282 0.3442	<b>-0.53482</b> <b>0.0028</b>	<b>0.52166</b> <b>0.0037</b>	<b>0.46813</b> <b>0.0104</b>	-0.26511 0.1646	0.02522 0.8910	-0.23711 0.1913	-0.27151 0.1328	0.40472 0.0216
<b>BCF</b>	0.02449 0.8924	-0.32714 0.0631	0.07512 0.6778	<b>0.48346</b> <b>0.0044</b>	<b>0.42575</b> <b>0.0135</b>	<b>-0.42421</b> <b>0.0139</b>	-0.25697 0.1704	0.31668 0.0882	0.10961 0.5642	-0.25086 0.1812	0.27114 0.1269	0.00584 0.9743	-0.00492 0.9783	-0.12728 0.4803
<b>STR</b>	<b>-0.53778</b> <b>0.0012</b>	0.25894 0.1456	0.09745 0.5895	<b>-0.50636</b> <b>0.0026</b>	<b>-0.49539</b> <b>0.0034</b>	<b>0.49087</b> <b>0.0037</b>	<b>0.48778</b> <b>0.0063</b>	<b>-0.52402</b> <b>0.0030</b>	-0.32651 0.0782	0.34637 0.0608	-0.20680 0.2482	0.05355 0.7673	0.08980 0.6192	-0.09574 0.5961
<b>Rápido</b>	<b>-0.87305</b> <b>&lt;.0001</b>	-0.03933 0.8280	0.23177 0.1943	-0.28180 0.1121	-0.23884 0.1807	0.23012 0.1976	0.27845 0.1362	-0.27810 0.1367	-0.17514 0.3546	0.00674 0.9718	-0.27222 0.1254	<b>0.35465</b> <b>0.0429</b>	<b>0.37122</b> <b>0.0334</b>	-0.21812 0.2227
<b>Médio</b>	-0.25774 0.1476	-0.07782 0.6669	-0.05293 0.7699	<b>0.46131</b> <b>0.0069</b>	0.33015 0.0606	-0.33184 0.0592	0.04409 0.8171	0.05431 0.7756	-0.25400 0.1756	-0.20751 0.2712	0.32991 0.0608	-0.12112 0.5020	-0.14026 0.4362	-0.13972 0.4380
<b>Lento</b>	-0.16576 0.3566	-0.12399 0.4918	-0.09973 0.5808	0.15115 0.4011	-0.21800 0.222	0.21701 0.2251	-0.07516 0.6930	0.02301 0.9039	0.21249 0.2596	0.04230 0.8243	-0.04932 0.7852	-0.25621 -0.25621	-0.22600 0.2060	0.21222 0.2357



Tabela 28 - Coeficientes de correlação e significância das variáveis obtidas na avaliação seminal das amostras glicerolizadas - São Paulo – 2012

	Estático	TB Ind	TB Esp	Fragm	JC1 elev	JC1 baixo	DAB I	DAB II	DAB III	DAB IV	FITC MI	FITC MA	FITC MP	FITC MPA
<b>Estático</b>	1.00000	0.07577 0.6752	-0.18053 0.3147	0.00029 0.9987	0.09302 0.6067	-0.08519 0.6374	-0.30421 0.1022	0.27296 0.1445	0.21566 0.2524	0.14000 0.4606	0.08140 0.6525	-0.23937 0.1797	-0.24666 0.1664	0.27403 0.1228
<b>TB Ind</b>		1.00000	-0.17240 0.3374	<b>-0.59058</b> <b>0.0003</b>	-0.33160 0.0594	0.33506 0.0566	0.07167 0.7066	-0.01792 0.9251	-0.30062 0.1065	0.26646 0.1546	0.44062 0.0103	-0.30632 0.0830	<b>-0.37606</b> <b>0.0310</b>	-0.07557 0.6760
<b>TB Esp</b>			1.00000	0.20947 0.2420	0.23535 0.1874	-0.23867 0.1810	0.24905 0.1845	-0.24973 0.1832	-0.18926 0.3165	-0.04887 0.7976	-0.19203 0.2844	<b>0.34662</b> <b>0.0481</b>	<b>0.38714</b> <b>0.0260</b>	-0.22959 0.1987
<b>Fragm</b>				1.00000	<b>0.55337</b> <b>0.0008</b>	<b>-0.55329</b> <b>0.0008</b>	-0.10258 0.5896	0.14039 0.4593	0.06342 0.7392	-0.27611 0.1397	0.01269 0.9441	-0.04766 0.7922	0.00357 0.9843	-0.01308 0.9424
<b>JC1 elev</b>					1.00000	<b>-0.99966</b> <b>&lt;.0001</b>	-0.15024 0.4281	0.22171 0.2390	0.05170 0.7861	<b>-0.42938</b> <b>0.0179</b>	0.28819 0.1039	0.08836 0.6249	0.08273 0.6471	-0.24690 0.1660
<b>JC1 baixo</b>						1.00000	0.14492 0.4448	-0.21791 0.2473	-0.04759 0.8028	<b>0.43459</b> <b>0.0164</b>	-0.28728 0.1050	-0.09259 0.6083	-0.08689 0.6306	0.24772 0.1645
<b>DAB I</b>							1.00000	<b>-0.94581</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>-0.53327</b> <b>0.0024</b>	-0.23917 0.2031	0.11367 0.5498	-0.14926 0.4311	-0.13331 0.4825	-0.21471 0.2545
<b>DAB II</b>								1.00000	0.28480 0.1272	0.10220 0.5910	-0.03815 0.8414	0.13833 0.4660	0.09884 0.6033	0.19421 0.3038
<b>DAB III</b>									1.00000	0.00362 0.9849	-0.13954 0.4621	0.13072 0.4911	0.14916 0.4315	0.06065 0.7502
<b>DAB IV</b>										1.00000	-0.19394 0.3045	-0.09648 0.6120	-0.03684 0.8467	0.23331 0.2147
<b>FITC MI</b>											1.00000	-0.33126 0.0597	<b>-0.41251</b> <b>0.0170</b>	<b>-0.47249</b> <b>0.0055</b>
<b>FITC MA</b>												1.00000	<b>0.98642</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>-0.53906</b> <b>0.0012</b>
<b>FITC MP</b>													1.00000	<b>-0.51263</b> <b>0.0023</b>
<b>FITC MPA</b>														1.00000

Tabela 29 - Coeficientes de correlação e significância das variáveis obtidas na avaliação seminal das amostras descongeladas - São Paulo – 2012

	Motilidade	Vigor	Íntegros E/N	MOT	PROG	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	Rápido	Médio	Lento
<b>Motilidade</b>	1.00000	<b>0.76759</b> <.0001	0.31891 0.0752	<b>0.76553</b> <.0001	<b>0.73429</b> <.0001	<b>0.68453</b> <.0001	<b>0.61948</b> <b>0.0002</b>	<b>0.54502</b> <b>0.0013</b>	-0.02959 0.8723	<b>-0.36072</b> <b>0.0425</b>	<b>0.38440</b> <b>0.0298</b>	<b>0.77928</b> <.0001	<b>0.50017</b> <b>0.0036</b>	0.22097 0.2242
<b>Vigor</b>		1.00000	<b>0.37278</b> <b>0.0356</b>	<b>0.73586</b> <.0001	<b>0.72580</b> <.0001	<b>0.52701</b> <b>0.0019</b>	<b>0.55288</b> <b>0.0010</b>	0.23876 0.1882	-0.30175 0.0933	-0.23809 0.1894	<b>0.51200</b> <b>0.0027</b>	<b>0.71891</b> <.0001	<b>0.57023</b> <b>0.0007</b>	<b>0.38414</b> <b>0.0300</b>
<b>Integros E/N</b>			1.00000	<b>0.35972</b> <b>0.0432</b>	<b>0.53259</b> <b>0.0017</b>	<b>0.58314</b> <b>0.0005</b>	<b>0.66268</b> <.0001	0.23663 0.1923	-0.32816 0.0667	-0.31914 0.0750	<b>0.67384</b> <.0001	<b>0.45086</b> <b>0.0096</b>	0.00449 0.9805	-0.06343 0.7258
<b>MOT</b>				1.00000	<b>0.89576</b> <.0001	<b>0.68075</b> <.0001	<b>0.61852</b> <b>0.0002</b>	<b>0.49369</b> <b>0.0041</b>	-0.19675 0.2804	-0.27537 0.1272	<b>0.42591</b> <b>0.0151</b>	<b>0.97811</b> <.0001	<b>0.80205</b> <.0001	0.33924 0.0575
<b>PROG</b>					1.00000	<b>0.81346</b> <.0001	<b>0.83563</b> <.0001	<b>0.46655</b> <b>0.0071</b>	-0.31175 0.0824	-0.20870 0.2517	<b>0.68210</b> <.0001	<b>0.94191</b> <.0001	<b>0.53927</b> <b>0.0014</b>	0.17192 0.3468
<b>VAP</b>						1.00000	<b>0.95042</b> <.0001	<b>0.76097</b> <.0001	-0.12588 0.4924	-0.33516 0.0608	<b>0.59327</b> <b>0.0003</b>	<b>0.78309</b> <.0001	0.20064 0.2709	-0.06609 0.7193
<b>VSL</b>							1.00000	<b>0.54186</b> <b>0.0014</b>	-0.34687 0.0518	-0.29744 0.0983	<b>0.80064</b> <.0001	<b>0.72238</b> <.0001	0.16260 0.3739	-0.11268 0.5392
<b>VCL</b>								1.00000	<b>0.39672</b> <b>0.0246</b>	-0.34590 0.0525	-0.00777 0.9663	<b>0.56572</b> <b>0.0007</b>	0.12737 0.4873	-0.07946 0.6655
<b>ALH</b>									1.00000	0.03524 0.8481	<b>-0.70397</b> <.0001	-0.17670 0.3333	-0.24674 0.1734	0.02045 0.9116
<b>BCF</b>										1.00000	-0.23826 0.1891	-0.25742 0.1549	-0.24373 0.1789	0.29970 0.0956
<b>STR</b>											1.00000	<b>0.48470</b> <b>0.0049</b>	0.16789 0.3584	-0.19018 0.2972
<b>Rápido</b>												1.00000	<b>0.66348</b> <.0001	0.25682 0.1559
<b>Médio</b>													1.00000	<b>0.48079</b> <b>0.0053</b>
<b>Lento</b>														1.00000

Tabela 29 - Coeficientes de correlação e significância das variáveis obtidas na avaliação seminal das amostras descongeladas - São Paulo – 2012

	Estático	TB Ind	TB Esp	Fragm	JC1elev	JC1 baixo	DAB I	DAB II	DAB III	DAB IV	FITC MI	FITC MA	FITC MP	FITC MPA
<b>Motilidade</b>	<b>-0.36662</b> <b>0.0390</b>	-0.20718 0.2552	-0.08056 0.6612	0.05067 0.7866	-0.06287 0.7325	0.12654 0.4901	<b>0.40750</b> <b>0.0206</b>	0.00939 0.9593	<b>-0.65902</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>-0.37266</b> <b>0.0357</b>	-0.29640 0.0995	<b>0.41713</b> <b>0.0175</b>	<b>0.47570</b> <b>0.0059</b>	-0.01476 0.9361
<b>Vigor</b>	<b>-0.44529</b> <b>0.0107</b>	0.03205 0.8618	-0.16353 0.3712	0.08347 0.6553	0.06888 0.7080	-0.02743 0.8815	<b>0.46560</b> <b>0.0072</b>	-0.08849 0.6301	<b>-0.67778</b> <b>&lt;.0001</b>	-0.31946 0.0747	-0.21204 0.2440	<b>0.44001</b> <b>0.0117</b>	<b>0.47149</b> <b>0.0064</b>	-0.07604 0.6791
<b>Integros E/N</b>	0.05603 0.7568	0.08647 0.6323	-0.23313 0.1917	-0.06948 0.7055	0.11084 0.5392	-0.10886 0.5465	<b>0.60989</b> <b>0.0002</b>	-0.27304 0.1242	<b>-0.60608</b> <b>0.0002</b>	<b>-0.37002</b> <b>0.0340</b>	-0.25038 0.1599	-0.22084 0.2168	-0.22977 0.1983	0.38941 0.0251
<b>MOT</b>	<b>-0.52706</b> <b>0.0019</b>	-0.00738 0.9680	-0.06875 0.7085	0.24757 0.1793	-0.08733 0.6346	0.14300 0.4349	0.22365 0.2185	0.24906 0.1692	<b>-0.63769</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>-0.40535</b> <b>0.0214</b>	<b>-0.45169</b> <b>0.0095</b>	<b>0.43314</b> <b>0.0133</b>	<b>0.45845</b> <b>0.0083</b>	0.24974 0.1680
<b>PROG</b>	<b>-0.35034</b> <b>0.0493</b>	-0.03176 0.8630	-0.11277 0.5389	0.17487 0.3468	-0.15324 0.4024	0.20475 0.2610	<b>0.42531</b> <b>0.0152</b>	0.04863 0.7915	<b>-0.7428</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>-0.40201</b> <b>0.0226</b>	<b>-0.48900</b> <b>0.0045</b>	0.33349 0.0621	<b>0.37197</b> <b>0.0361</b>	0.28429 0.1148
<b>VAP</b>	-0.13051 0.4765	-0.16175 0.3765	-0.11821 0.5193	-0.02766 0.8826	-0.18899 0.3002	0.25160 0.1648	<b>0.49185</b> <b>0.0042</b>	-0.15551 0.3954	<b>-0.56516</b> <b>0.0008</b>	<b>-0.34479</b> <b>0.0533</b>	-0.33144 0.0639	0.08183 0.6561	0.11440 0.5330	0.18658 0.3066
<b>VSL</b>	-0.05498 0.7651	-0.09743 0.5958	-0.08347 0.6497	-0.04751 0.7996	-0.16923 0.3545	0.20998 0.2487	<b>0.57742</b> <b>0.0005</b>	-0.22061 0.2250	<b>-0.64289</b> <b>&lt;.0001</b>	-0.34761 0.0512	<b>-0.38641</b> <b>0.0289</b>	0.05169 0.7787	0.08173 0.6566	0.26942 0.1359
<b>VCL</b>	-0.13747 0.4531	-0.14800 0.4189	-0.18099 0.3215	-0.04147 0.8247	-0.16433 0.3688	0.25052 0.1667	0.15681 0.15681	-0.02305 0.9004	-0.18852 0.3015	-0.16200 0.3757	-0.09213 0.6160	0.08621 0.6390	0.12542 0.4940	-0.09028 0.6231
<b>ALH</b>	0.04955 0.7877	-0.12474 0.4964	-0.11399 0.5345	-0.16174 0.3847	-0.06056 0.7419	0.12526 0.4945	-0.25131 0.1653	-0.01067 0.9538	<b>0.42886</b> <b>0.0143</b>	0.20752 0.2544	0.25266 0.1630	-0.07668 0.676	-0.06396 0.7280	-0.29607 0.0999
<b>BCF</b>	-0.18724 0.3048	0.11167 0.5429	0.01623 0.9298	0.29436 0.1080	0.21263 0.2426	-0.21526 0.2367	-0.18922 0.2996	0.06998 0.7035	0.10534 0.5661	0.24007 0.1857	0.09856 0.5915	0.01849 0.9200	0.00295 0.9872	-0.10019 0.5853
<b>STR</b>	0.11199 0.5417	0.10458 0.5690	0.09404 0.6087	-0.10576 0.5712	-0.07664 0.6768	0.05729 0.7555	<b>0.55385</b> <b>0.0010</b>	-0.15823 0.3871	<b>-0.64652</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>-0.39582</b> <b>0.0249</b>	<b>-0.43894</b> <b>0.0120</b>	0.04066 0.8251	0.05183 0.7781	<b>0.42424</b> <b>0.0155</b>
<b>Rápido</b>	-0.45409 0.0090	-0.08445 0.6459	-0.09794 0.5938	0.20952 0.2580	-0.13524 0.4605	0.19588 0.2826	0.31431 0.0798	0.16242 0.3745	<b>-0.67852</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>-0.41807</b> <b>0.0173</b>	<b>-0.45064</b> <b>0.0096</b>	<b>0.38761</b> <b>0.0284</b>	<b>0.41612</b> <b>0.0178</b>	0.26681 0.1399
<b>Médio</b>	<b>-0.59195</b> <b>0.0004</b>	0.22193 0.2222	0.06859 0.7091	0.30386 0.0965	0.06936 0.7060	-0.04453 0.8088	-0.09184 0.6171	<b>0.43929</b> <b>0.0119</b>	<b>-0.36489</b> <b>0.0400</b>	-0.27401 0.1291	<b>-0.35648</b> <b>0.0452</b>	<b>0.43350</b> <b>0.0132</b>	<b>0.44443</b> <b>0.0108</b>	0.16538 0.3657
<b>Lento</b>	<b>-0.88334</b> <b>&lt;.0001</b>	-0.09003 0.6183	<b>-0.3758</b> <b>0.0311</b>	0.18764 0.3038	0.26670 0.1335	-0.20114 0.2617	-0.04853 0.7886	0.03520 0.8458	-0.15428 0.3913	0.16535 0.3578	0.26053 0.1431	0.19897 0.2670	0.18967 0.2904	<b>-0.38445</b> <b>0.0272</b>

Tabela 29 - Coeficientes de correlação e significância das variáveis obtidas na avaliação seminal das amostras descongeladas - São Paulo – 2012

	Estático	TB Ind	TB Esp	Fragm	JC1 elev	JC1 baixo	DAB I	DAB II	DAB III	DAB IV	FITC MI	FITC MA	FITC MP	FITC MPA
<b>Estático</b>	1.00000	0.11021 0.5415	<b>0.37338</b> <b>0.0323</b>	-0.28494 0.1140	-0.11723 0.5159	0.05087 0.7786	0.07777 0.6671	-0.14657 0.4157	0.27430 0.1224	-0.13830 0.442	-0.20652 0.2489	-0.32852 0.0620	-0.31989 0.0696	<b>0.35706</b> <b>0.0414</b>
<b>TB Ind</b>		1.00000	0.06934 0.7014	-0.20892 0.2512	<b>0.35952</b> <b>0.0399</b>	<b>-0.39774</b> <b>0.0219</b>	-0.15402 0.3921	0.23136 0.1951	-0.02198 0.9033	-0.04481 0.8045	-0.09940 0.5821	-0.05493 0.7614	-0.06245 0.7299	-0.09940 0.5821
<b>TB Esp</b>			1.00000	0.20289 0.2654	0.00400 0.9824	-0.05317 0.7689	-0.12165 0.5001	0.31024 0.0789	0.03201 0.8596	-0.29790 0.0922	<b>-0.52087</b> <b>0.0019</b>	-0.06395 0.7237	-0.04156 0.8184	<b>-0.52087</b> <b>0.0019</b>
<b>Fragm</b>				1.00000	0.19368 0.2882	-0.19593 0.2825	0.18878 0.3008	-0.03493 0.8495	-0.22398 0.2178	-0.12762 0.4864	-0.11719 0.5230	0.24457 0.1773	0.23199 0.2014	0.03810 0.8360
<b>JC1 elev</b>					1.00000	-0.98967 <.0001	0.05975 0.7412	-0.01813 0.9203	-0.20298 0.2573	0.09621 0.5943	-0.04268 0.8136	-0.25564 0.1510	-0.22110 0.2163	-0.04268 0.8136
<b>JC1 baixo</b>						1.00000	-0.04889 0.7870	0.00417 0.9816	0.19257 0.2830	-0.09029 0.6173	0.06262 0.7292	0.27931 0.1154	0.24748 0.1650	0.06262 0.7292
<b>DAB I</b>							1.00000	<b>-0.71618</b> <b>&lt;.0001</b>	<b>-0.55536</b> <b>0.0008</b>	<b>-0.46145</b> <b>0.0069</b>	-0.15235 0.3973	-0.06212 0.7313	-0.02324 0.8979	0.05609 0.7566
<b>DAB II</b>								1.00000	-0.01747 0.9231	-0.17444 0.3316	-0.16658 0.3542	0.29389 0.0969	0.25975 0.1444	0.28062 0.1137
<b>DAB III</b>									1.00000	<b>0.39663</b> <b>0.0223</b>	<b>0.40510</b> <b>0.0194</b>	-0.15767 0.3809	-0.19728 0.2711	<b>0.40510</b> <b>0.0194</b>
<b>DAB IV</b>										1.00000	0.26973 0.1290	-0.24321 0.1726	-0.23180 0.1943	0.26973 0.1290
<b>FITC MI</b>											1.00000	-0.01653 0.9272	-0.11233 0.5337	<b>-0.68359</b> <b>&lt;.0001</b>
<b>FITC MA</b>												1.00000	<b>0.97782</b> <b>&lt;.0001</b>	-0.13268 0.4617
<b>FITC MP</b>													1.00000	-0.16754 0.3514
<b>FITC MPA</b>														1.00000

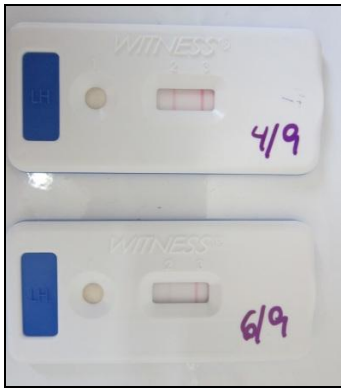
## 6.2 ETAPA II

Os resultados da avaliação *in vivo* são apresentados abaixo.


### 6.2.1 Acompanhamento do Ciclo Estral das Fêmeas Inseminadas

O acompanhamento reprodutivo das fêmeas inseminadas segundo o delineamento experimental (Quadros 2 a 7) possibilitou detectar a data do pico de LH (Figuras 8 a 13) e, desta maneira, realizar as inseminações artificiais nos dias 5<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> após o pico de LH. As fêmeas 1, 2 e 4 compuseram o grupo IA-GSH10, enquanto as fêmeas 3, 5 e 6 foram alocadas no grupo IA-GSH0.

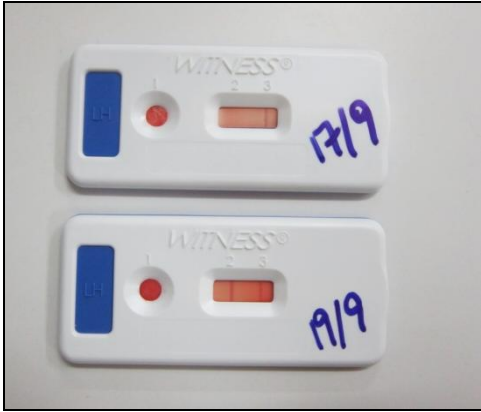
Quadro 2 – Dados do acompanhamento do ciclo estral e da inseminação artificial da fêmea 1.

FÊMEA 1	
26/08/2011 – Início do proestro	
02/09/2011 – Citologia vaginal: 60% de células superficiais anucleadas e queratinizadas, 40% de células superficiais nucleadas, 10% de células intermediárias Vaginoscopia: pregueamento primário e início de pregueamento secundário Dosagem de progesterona: 0,41 ng/mL	
04/09/2011 – Citologia vaginal: 90% de células superficiais anucleadas e queratinizadas, 10% de células superficiais nucleadas. Vaginoscopia: pregueamento primário e secundário. Dosagem de progesterona: 1,05 ng/mL Teste de LH: positivo fraco (+/-)	
05/09/2011 – não avaliada	
06/09/2011 – Citologia vaginal: 90% de células superficiais anucleadas e queratinizadas, 10% de células superficiais nucleadas. Vaginoscopia: pregueamento primário e secundário. Teste de LH: negativo	
<p>Figura 8- Resultado da dosagem de LH (Kit Witness LH) da fêmea 1</p> 	
Considerado pico de LH no dia 05/09/2011	
10/09/2011 – IA intra-vaginal com 400 milhões de espermatozoides viáveis. Análise pós-descongelção: motilidade espermática de 50% e vigor espermático 4	
11/09/2011 – IA intra-uterina com 600 milhões de espermatozoides viáveis. Análise pós-descongelção: motilidade espermática de 50% e vigor espermático 3	
12/09/2011 – Diestro citológico	

Quadro 3 – Dados do acompanhamento do ciclo estral e da inseminação artificial da fêmea 2

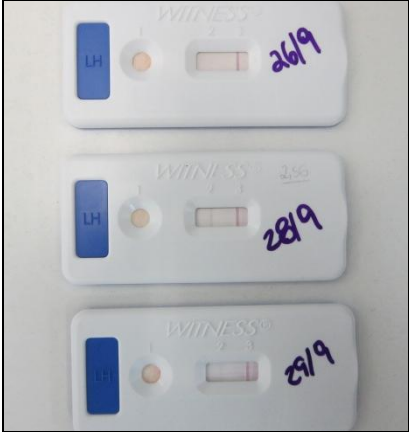
FÊMEA 2	
06/09/2011 – Início do proestro	
11/09/2011 – Citologia vaginal: 30% de células superficiais anucleadas e queratinizadas, 50% de células superficiais nucleadas e 20% de células intermediárias Vaginoscopia: pregueamento primário e início de pregueamento secundário	
13/09/2011 – Citologia vaginal: 80% de células superficiais anucleadas e queratinizadas e 20% de células superficiais nucleadas. Vaginoscopia: pregueamento primário e secundário. Dosagem de progesterona: 1,15 ng/mL Teste de LH: negativo	
14/09/2011 - Citologia vaginal: 80% de células superficiais anucleadas e queratinizadas e 20% de células superficiais nucleadas. Vaginoscopia: pregueamento primário e secundário. Teste de LH: positivo fraco (+/-)	
15/09/2011 – Citologia vaginal: 90% de células superficiais anucleadas e queratinizadas e 10% de células superficiais nucleadas. Vaginoscopia: pregueamento primário e secundário. Dosagem de progesterona: 2,73 ng/mL Teste de LH: positivo	
<p>Figura 9- Resultado da dosagem de LH (Kit Witness LH) da fêmea 2</p> 	
Considerado pico de LH no dia 15/09/2011	
20/09/2011 – IA intra-uterina com 350 milhões de espermatozoides viáveis. Análise pós-descongelção: motilidade espermática de 50% e vigor espermático 3	
21/09/2011 – IA intra-uterina com 300 milhões de espermatozoides viáveis. Análise pós-descongelção: motilidade espermática de 50% e vigor espermático 2-3	
24/09/2011 – Diestro citológico	

Quadro 4 – Dados do acompanhamento do ciclo estral e da inseminação artificial da fêmea 3.


FÊMEA 3	
17/09/2011– Citologia vaginal: 60% de células superficiais anucleadas e queratinizadas, 40% de células superficiais nucleadas e 10% de células intermediárias Vaginoscopia: pregueamento primário e início de secundário Teste de LH: negativo	
19/09/2011 – Citologia vaginal: 90% de células superficiais anucleadas e queratinizadas e 10% de células superficiais nucleadas. Teste de LH: positivo	
20/09/2011 – Citologia vaginal: 90% de células superficiais anucleadas e queratinizadas e 10% de células superficiais nucleadas. Vaginoscopia: pregueamento primário e secundário evidente, mucosa pálida. Dosagem de progesterona: 5,4 ng/mL Teste de LH: negativo	
<p>Figura 10- Resultado da dosagem de LH (Kit Witness LH) da fêmea 3</p> 	
Considerado pico de LH no dia 19/09/2011	
24/09/2011 – IA intra-uterina com 400 milhões de espermatozoides viáveis. Análise pós-descongelção: motilidade espermática de 70% e vigor espermático 3	
25/09/2011 – IA intra-uterina com 300 milhões de espermatozoides viáveis. Análise pós-descongelção: motilidade espermática de 70% e vigor espermático 2-3	
29/09/2011 – Diestro citológico	




Quadro 5 – Dados do acompanhamento do ciclo estral e da inseminação artificial da fêmea 4.

FÊMEA 4	
23/09/2011 – Início do proestro	
26/09/2011– Citologia vaginal: 60% de células superficiais anucleadas e queratinizadas, 40% de células superficiais nucleadas e 10% células intermediárias Vaginoscopia: pregueamento primário Teste de LH: negativo	
28/09/2011 – Citologia vaginal: 80% de células superficiais anucleadas e queratinizadas e 20% células superficiais nucleadas. Dosagem de progesterona: 2,56 ng/mL Teste de LH: positivo	
<p>Figura 11- Resultado da dosagem de LH (Kit Witness LH) da fêmea 4</p>  <p>The image shows three Witness LH test strips arranged vertically. Each strip has a blue window on the left labeled 'LH' and a white window on the right. The top strip is dated '26/9' and shows a single horizontal line in the white window, indicating a negative result. The middle strip is dated '28/9' and shows two horizontal lines in the white window, indicating a positive result. The bottom strip is dated '29/9' and also shows two horizontal lines in the white window, indicating a positive result.</p>	
Considerado pico de LH dia 28/09/2011	
03/10/2011 – IA intra-uterina com 350 milhões de espermatozóides viáveis. Análise pós-descongelção: motilidade espermática de 50% e vigor espermático 3	
04/10/2011 – IA intra-uterina com 300 milhões de espermatozóides viáveis. Análise pós-descongelção: motilidade espermática de 30% e vigor espermático 2-3	
09/10/2011 – Diestro citológico	

Quadro 6 – Dados do acompanhamento do ciclo estral e da inseminação artificial da fêmea 5

FÊMEA 5	
17/10/2011	– Início do proestro
20/10/2011	– Citologia vaginal: 30% de células superficiais anucleadas e queratinizadas, 60% de células superficiais nucleadas e 10% de células intermediárias Vaginoscopia: preeamento primário
22/10/2011	– Citologia vaginal: 70% de células superficiais anucleadas e queratinizadas, 20% de células superficiais nucleadas e 10% de células intermediárias Vaginoscopia: preeamento primário. Teste de LH: positivo fraco (+/-)
23/10/2011	– Citologia vaginal: 80% de células superficiais anucleadas e queratinizadas e 20% de células superficiais nucleadas. Vaginoscopia: preeamento primário e início de secundário. Dosagem de progesterona: 2,28 ng/mL Teste de LH: positivo
<p>Figura 12- Resultado da dosagem de LH (Kit Witness LH) da fêmea 5</p> 	
24/10/2011	– Citologia vaginal: 80% de células superficiais anucleadas e queratinizadas e 20% de células superficiais nucleadas. Vaginoscopia: preeamento primário e início de secundário. Dosagem de progesterona: 3,60 ng/mL Teste de LH: negativo
Considerado pico de LH dia 23/10/2011	
28/10/2011	– IA intra-uterina com 150 milhões de espermatozoides viáveis. Análise pós-descongelção: motilidade espermática de 30% e vigor espermático 2-3
29/10/2011	– IA intra-uterina com 315 milhões de espermatozoides viáveis. Análise pós-descongelção: motilidade espermática de 70% e vigor espermático 3
31/10/2011	– Diestro citológico

Quadro 7 – Dados do acompanhamento do ciclo estral e da inseminação artificial da fêmea 6

FÊMEA 6	
29/01//2012	– Início do proestro
02/02//2012	– Citologia vaginal: 30% de células superficiais anucleadas e queratinizadas, 60% de células superficiais nucleadas e 10% de células intermediárias Vaginoscopia: pregueamento primário e início de secundário Teste LH positivo fraco (-/+)
03/02/2012	– Citologia vaginal: 90% de células superficiais anucleadas e queratinizadas e 10% de células superficiais nucleadas Vaginoscopia: pregueamento primário e secundário Dosagem de progesterona: 1,05ng/mL Teste de LH positivo
04/02/2012	– Citologia vaginal: 90% de células superficiais anucleadas e queratinizadas e 10% de células superficiais nucleadas Vaginoscopia: pregueamento primário e secundário Dosagem de progesterona: 1,05ng/mL Teste de LH positivo fraco (-/+)
<p>Figura 13- Resultado da dosagem de LH (Kit Witness LH ) da fêmea 6</p> 	
Considerado pico de LH dia 03/02/2012	
08/02/2012	– IA intra-uterina com 150 milhões de espermatozóides viáveis. Análise pós-descongelamento: motilidade espermática de 30% e vigor espermático 2-3
09/02/2012	– IA intra-uterina com 315 milhões de espermatozóides viáveis. Análise pós-descongelamento: motilidade espermática de 70% e vigor espermático 3
12/02/2012	– Diestro citológico

As fêmeas inseminadas foram acompanhadas por ultrassonografia periodicamente até o diagnóstico de gestação e não foram observados efeitos adversos, como lesões vaginais ou contaminação ou infecções uterinas após as inseminações.

Aos 30 dias após a primeira inseminação artificial, foi diagnosticada a gestação das fêmeas 2 e 4, pertencentes ao grupo IA-GSH10 e das fêmeas 5 e 6 pertencentes ao grupo IA-GSH0, conforme ilustrado na tabela 30 e figura 14.

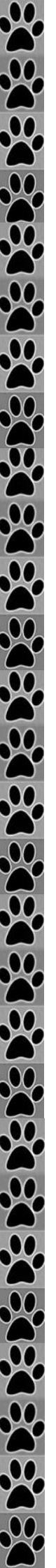
Tabela 30 - Diagnóstico de gestação e número de filhotes das fêmeas inseminadas com sêmen criopreservado - São Paulo – 2012

Fêmea	Diagnóstico de gestação	Número de filhotes
1	Negativo	-
2	Positivo	6 filhotes
3	Negativo	-
4	Positivo	1 filhote
5	Positivo	1 filhote
6	Positivo	8 filhotes

Figura 14 - Filhotes nascidos de inseminação artificial com sêmen criopreservado por meio de endoscopia transcervical (a), ultrassonografia da fêmea 2 (b)



## *Discussão*



## 7 DISCUSSÃO

A presença e disponibilidade de agentes antioxidantes são essenciais para a prevenção de lesões nas membranas celulares. Entretanto, a remoção do plasma seminal, bem como a diluição realizada previamente à criopreservação, reduzem de maneira drástica a disponibilidade de tais agentes para a proteção celular (FARSTAD, 2009). O processo de criopreservação reduz a concentração de GSH do plasma seminal em até 68%, diminuindo sua disponibilidade como antioxidante (GADEA et al., 2011). Portanto, a adição da glutathiona ao diluidor é uma tentativa de reposição, visando a proteger a célula espermática das injúrias promovidas pela produção intensa de radicais livres inerentes ao processo de criopreservação.

### 7.1 EFEITO DO TRATAMENTO ANTIOXIDANTE DA GSH EM DISTINTAS CONCENTRAÇÕES (0 mM, 10 mM e 20 mM)

No presente experimento, a redução da motilidade espermática pós-descongelação, conforme a suplementação do antioxidante, demonstra que a glutathiona não promoveu o efeito protetor esperado. Outrossim, o efeito deletério mais acentuado ocorreu no grupo contendo a maior concentração de glutathiona reduzida. Por outro lado, Fatma et al. (2012) relatam haver correlação positiva entre a concentração fisiológica de GSH no plasma seminal e a motilidade espermática em homens, sugerindo a dosagem de tal antioxidante como forma de avaliar a fertilidade masculina. Segundo Gadea et al. (2011), a adição de 1 ou 5 mM de GSH ao meio de descongelação levou à melhora na motilidade e vigor espermático de homens. Os mesmos autores afirmam que a queda na concentração de GSH acarreta em prejuízos à motilidade espermática, sendo importante sua suplementação durante a criopreservação seminal. Entretanto, no presente experimento a concentração de 20 mM de GSH mostrou-se deletéria à motilidade espermática, ao exercer possível efeito tóxico.

Nos grupos experimentais tratados com glutathiona (GSH10 e GSH20), foi observada correlação *positiva* entre a porcentagem de espermatozóides com lesão das membranas plasmática ou acrossomal com a motilidade espermática (subjetiva, total e progressiva), vigor, alta atividade mitocondrial e índice de espermatozóides rápidos. Ademais, houve correlação

*negativa* com a ausência de atividade mitocondrial e o estresse oxidativo (TBARS induzido). Entretanto, apenas no grupo GSH20, a motilidade correlacionou *negativamente* com o estresse oxidativo. Tais achados sugerem que a demanda de 10 mM de GSH aos espermatozóides ocorre por meio da indução de hipermotilidade e alterações da permeabilidade das membranas espermáticas, características encontradas durante o processo de capacitação espermática. Já a concentração de 20 mM de glutatona apresentou-se excessiva, por causar efeitos semelhantes ao estresse oxidativo e, em última análise, reduzindo a habilidade de deslocamento dos espermatozóides.

O processo de capacitação espermática envolve mudanças bioquímicas e estruturais da membrana plasmática do espermatozóide, com conseqüente alteração na permeabilidade da célula espermática. Tal processo inicia-se na membrana plasmática e resulta em alterações tanto morfológicas (reação acrossômica) quanto fisiológicas (hiperativação do flagelo). A capacitação espermática é completa quando ocorre a reação acrossômica, caracterizada pela fusão da membrana plasmática à acrossomal externa, resultando na formação de vesículas e permitindo a liberação de enzimas do conteúdo acrossomal (EDDY, 2006). Na dependência da concentração, a GSH exerce efeito protetor, inibindo a reação acrossômica provocada precocemente pela criopreservação (STRADAIOLI et al., 2007). Em bovinos, a adição de 5 mM de GSH promove efeito protetor das membranas acrossomal e plasmática (PERUMAL et al., 2011). Entretanto, no presente experimento, a maior lesão das membranas plasmática ou acrossomal pode estar relacionada ao processo de pré-capacitação espermática, sendo descartada a possibilidade de morte celular. Contudo, no grupo GSH20, a queda da motilidade espermática por aumento do estresse oxidativo indica que as modificações espermáticas passam a ser deletérias, conforme a maior suplementação de glutatona. Infere-se que haja um efeito cumulativo do agente antioxidante na célula espermática, o qual culmina com alterações similares às aquelas ocorridas durante o estresse oxidativo (efeito pró-oxidante).

Segundo Thomson et al. (2009), o processo de criopreservação seminal tem como conseqüência a fragmentação do DNA da célula espermática, por maior estresse oxidativo. A fragmentação de DNA não altera os parâmetros comumente avaliados na análise seminal de rotina, portanto, espermatozóides com lesão de DNA são capazes de fecundar os oócitos. Entretanto, a gestação pode comprometer-se por falha genética embrionária (SAKKAS et al., 2002, SIMÕES, 2010). No grupo GSH20, foi observado maior porcentagem de espermatozóides com fragmentação de DNA, corroborando a intensa ação deletéria (efeito pró-oxidante) da suplementação de 20 mM de GSH ao meio de criopreservação. O excesso de

glutaciona reduzida (GSH20) suplantou os efeitos iniciais do estresse oxidativo (lesões das membranas plasmática e acrossomal), vencendo os mecanismos de proteção do material genético do espermatozóide, resultado não verificado na suplementação de 10 mM de GSH.

## 7.2 EFEITO DO TRATAMENTO ANTIOXIDANTE DA GSH EM DISTINTAS CONCENTRAÇÕES (0 mM, 10 mM E 20 mM) NAS AMOSTRAS PÓS-DESCONGELAÇÃO

À análise computadorizada da motilidade espermática nas amostras descongeladas, evidenciou-se maior dano no grupo GSH20, pois além da menor motilidade, vigor espermático e velocidade de deslocamento, houve elevado número de espermatozóides estáticos. Tais resultados podem ser atribuídos ao comprometimento da atividade mitocondrial pós-descongelação com a adição de 20 mM de glutaciona, porém sem alterações no potencial de membrana mitocondrial.

Os resultados do presente experimento demonstram que a suplementação de GSH ao diluidor não promoveu a proteção espermática esperada nos testes *in vitro*. Em experimento anterior na espécie canina, Monteiro et al. (2008) relataram que a adição de 5 mM de glutaciona ao diluidor promoveu ação protetora sobre as células espermáticas após a criopreservação. Por outro lado, a adição de 10 mM de GSH realizada no presente experimento não melhorou consistentemente a qualidade espermática pós-descongelação e a concentração de 20 mM, inclusive, promoveu efeitos deletérios, especialmente na atividade mitocondrial espermática, podendo comprometer a fertilidade dos espermatozóides.

Embora não tenha sido previsto a determinação de enzimas antioxidantes neste experimento, pode-se inferir que o efeito indesejado da suplementação de GSH pode decorrer da falha em sua metabolização. O déficit espermático das enzimas glutaciona redutase e glutaciona peroxidase levaria ao excesso de glutaciona reduzida no meio extracelular. Consequentemente, há alteração da osmolaridade e, por conseguinte, desidratação da célula espermática. Embora o efeito tóxico direto da glutaciona sobre os espermatozóides não tenha sido descrito anteriormente, pode-se sugerir também como possível efeito deletério diretamente sobre a célula espermática.



Apesar da influência adversa da suplementação de 20 mM de GSH ao meio diluidor, as amostras descongeladas dos grupos tratados (GSH10 e GSH20) apresentaram menor taxa de lesão da membrana acrossomal. De forma semelhante, Stradaioli et al. (2007) descreveram menor índice de reação acrossomal com o uso de elevados níveis de glutathione em diluidores para criopreservação de sêmen bovino. Ainda, Gadea et al. (2007) observaram maior número de espermatozoides não capacitados após a adição de GSH ao meio de descongelamento. A integridade acrossomal é importante para evitar a perda de enzimas necessárias para a reação acrossomal no momento da fecundação. A elevada concentração de GSH não foi capaz de impedir o início do processo de capacitação espermática, o qual envolve mudanças na cinética da célula espermática, entretanto, promoveu proteção contra a reação acrossomal precoce, preservando a integridade da membrana acrossomal.

### 7.3 EFEITO DAS ETAPAS DE CRIOPRESERVAÇÃO SEMINAL (REFRIGERAÇÃO, GLICEROLIZAÇÃO E PÓS-DESCONGELAMENTO)

À avaliação das etapas da criopreservação, evidencia-se que, apesar da exposição ao nitrogênio líquido e posterior descongelamento serem momentos cruciais, algumas alterações da qualidade espermática iniciam-se após o período de glicerolização. Segundo Watson (1995), a criopreservação compromete, principalmente, a motilidade espermática, pois a exposição ao crioprotetor submete o espermatozoide ao estresse osmótico e a congelamento, à formação de cristais de gelo (WATSON, 1995; MEYERS, 2005). De fato, no presente experimento, os espermatozoides pós-descongelamento sofreram perda da motilidade subjetiva quando comparado à refrigeração, independente da suplementação de glutathione (GSH0, GSH10 e GSH20). Ainda, na avaliação computadorizada da motilidade (CASA), a glicerolização promoveu redução da porcentagem de espermatozoides móveis e menor velocidade de deslocamento. Neste mesmo momento de observação, houve redução significativa de espermatozoides com elevada atividade mitocondrial (DAB I), em relação à refrigeração. Em função da correlação positiva da motilidade espermática com o DAB I, é possível atribuir uma relação de causa e efeito entre tais variáveis. Vale dizer, a redução da atividade mitocondrial após a glicerolização compromete a motilidade espermática. Como explicação para tais resultados da etapa de adição do crioprotetor, verificamos ocorrer aumento significativo do

estresse oxidativo (TBARS espontâneo), em relação à refrigeração. Portanto, a formação de radicais livres pode afetar a atividade mitocondrial dos espermatozóides e, em última análise, prejudicar a motilidade e velocidade espermáticas após a glicerolização.

Após a descongelação, evidenciou-se menor motilidade espermática, diminuição da porcentagem de espermatozóides com movimento progressivo e aumento dos espermatozóides estáticos. Ainda durante a descongelação, houve aumento da taxa de espermatozóides com atividade mitocondrial comprometida (DAB III) e ausente (DAB IV), bem como correlação negativa de tais variáveis com a motilidade espermática. Desta maneira, é possível justificar a referida queda da motilidade após a congelação, por menor atividade mitocondrial dos espermatozóides. Ademais, a descongelação, quando comparada à refrigeração e glicerolização, apresentou maior percentual de espermatozóides com baixo potencial de membrana mitocondrial (JC1), corroborando a menor motilidade em tal momento de avaliação. A adequada atividade mitocondrial é a forma de promoção de energia para o batimento flagelar, portanto, fundamental para a aquisição da motilidade espermática e capacidade fecundante. De fato, Donnelly et al. (2000) encontraram correlação negativa entre a motilidade espermática e alterações na função mitocondrial no sêmen humano. Ainda, Troiano (1998) verificou correlação positiva entre a motilidade espermática e o elevado potencial de membrana mitocondrial.

O prejuízo na motilidade espermática pode ser consequência, principalmente, da intensa produção de radicais livres. Neste experimento, o estresse oxidativo iniciou-se após a glicerolização, porém, as amostras descongeladas foram mais intensamente afetadas. Adicionalmente, foi verificada correlação positiva entre TBARS espontâneo e a porcentagem de espermatozóides estáticos pós-descongelação. Apesar do estresse oxidativo poder ser a causa da lesão mitocondrial, resultando no decréscimo da motilidade espermática, pode-se atribuir também uma relação de consequência. Assim, o processo de criopreservação favorece o aparecimento de maior quantidade de espermatozóides mortos e defeituosos, capazes de gerar espécies reativas de oxigênio (SALEH; AGARWAL, 2002). Além disto, a criopreservação promove queda na temperatura do espermatozóide e diminui a ação do sistema antioxidante por remoção do plasma seminal (BAILEY et al., 2000; BILODEAU et al., 2000).

A motilidade espermática é uma das características mais importantes para inferir a capacidade fecundante, expressando a viabilidade e integridade estrutural dos espermatozóides (VERSTEGEN et al., 2002). De fato, no presente experimento, a análise

computadorizada da motilidade espermática (CASA) indica queda da capacidade fecundante das amostras glicerolizadas e descongeladas, por haver diminuição da velocidade média de percurso (VAP), velocidade retilínea (VSL), velocidade curvilínea (VCL) e amplitude do movimento lateral da cabeça (ALH) dos espermatozóides.

Neste estudo, as amostras descongeladas apresentaram simultaneamente menor motilidade espermática subjetiva e computadorizada, além de maior lesão das membranas plasmática e acrossomal, bem como maior estresse oxidativo (TBARS), em comparação à refrigeração e glicerolização. Segundo Bansal, Bilaspuri (2010), o estresse oxidativo em excesso altera diretamente a integridade da membrana plasmática dos espermatozóides, por promover a peroxidação lipídica e comprometer a funcionalidade espermática. A intensa produção de radicais livres, o choque térmico e a formação de cristais de gelo intracelulares durante a criopreservação também podem ser causadores da lesão de membrana plasmática (GUTHRIE; WELCH, 2005).

A alteração de membrana plasmática durante a criopreservação pode levar o espermatozóide ao processo de pré-capacitação. As amostras refrigeradas do presente experimento apresentaram correlação positiva entre a porcentagem de espermatozóides estáticos, a taxa de lesão da membrana plasmática, potencial mitocondrial elevado (JC1) e frequência de batimento flagelar cruzado (BCF), sugerindo haver capacitação mecânica com possível agregação entre cabeças e hipermotilidade, características do processo de capacitação espermática. Na descongelação, tal processo espermático também pode ser inferido, pois houve correlação positiva entre a motilidade e movimento espermático progressivo e rápido com o índice de lesão de membrana plasmática ou acrossomal. Entretanto, após a descongelação, a porcentagem de espermatozóides estáticos correlacionou positivamente com o estresse oxidativo e a taxa de lesão de membrana plasmática e acrossomal, diferentemente do observado após a refrigeração, sugerindo haver fase final de morte celular. As mudanças na permeabilidade celular nas diferentes fases da criopreservação podem favorecer o influxo de cálcio para o interior dos espermatozóides, simulando características semelhantes às aquelas observadas durante a capacitação espermática. Tais achados apontam para a queda na resistência espermática e alterações no seu microambiente após a criopreservação. Desta forma, torna-se fundamental o imediato uso do sêmen pós-descongelação na inseminação artificial.

#### 7.4 TESTE *IN VIVO*

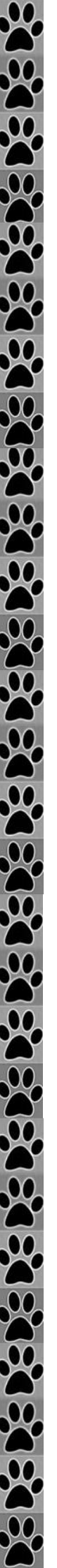
A avaliação *in vivo* demonstrou que a adição de 10 mM de GSH ao meio de criopreservação não diferiu do grupo controle (sem antioxidante), em relação ao número de gestações e filhotes por ninhada. Apesar das alterações seminais detectadas no grupo GSH10 nos testes *in vitro*, não houve influência do antioxidante na capacidade fecundante dos espermatozoides. Por outro lado, Perumal et al. (2011) verificaram maior taxa de concepção com a adição de 5 mM de GSH ao meio de criopreservação em bovinos. Em nosso estudo, os resultados da avaliação *in vitro* sugerem que a adição de GSH inibiu a reação acrossomal induzida pela criopreservação seminal, porém não foi detectada diferença na capacidade de fecundação dos espermatozoides com ou sem glutathiona no meio diluidor. Portanto, pode-se inferir que a alteração acrossomal gerada durante a criopreservação não comprometeu a habilidade espermática para a penetração oocitária.

A inseminação artificial por endoscopia transcervical é a técnica mais adequada para o sêmen criopreservado, principalmente por permitir o depósito seminal próximo ao local de fecundação. Quando comparada à inseminação por laparotomia, apresenta melhor aplicabilidade, por não haver necessidade de submeter o animal a protocolo anestésico ou procedimento cirúrgico (PRETZER et al., 2006; THOMASSEN; FARSTAD, 2008). No presente experimento, o acompanhamento do ciclo estral das cadelas foi realizado de maneira criteriosa, pois a execução da técnica de inseminação artificial no momento adequado é imprescindível para o sucesso de tal biotecnologia. O seguimento diário do ciclo estral, a dosagem sérica de progesterona e de LH possibilitaram a identificação acurada do momento estabelecido para a realização das inseminações (quinto e sexto dia após o pico de LH). Apesar do reduzido número de cadelas, é interessante verificar que alguns animais apresentaram o pico de LH simultaneamente ao resultado superior a 1,9 ng/mL na dosagem de progesterona (fêmeas 3, 5 e 6). Vale ressaltar que o pico de LH ocorre quando há aumento relativo da progesterona circulante, portanto, o acompanhamento reprodutivo diário torna-se de extrema importância quando o intuito é a utilização de sêmen congelado. Desta forma, sugere-se a identificação do dia no qual o pico de LH ocorre, seja por método direto ou indireto por meio da análise conjunta da concentração seriada de progesterona e exame ginecológico.

A técnica de inseminação artificial por endoscopia transcervical requer treinamento adequado, assim como conhecimento preciso da anatomia do trato reprodutivo da cadela, de modo a evitar lesões e possibilitar a mais rápida localização da cérvix. Neste estudo, a manipulação do endoscópio, bem como a identificação do óstio cervical e introdução do cateter de inseminação, exigiram paciência do técnico e contenção adequada da fêmea. Embora não tenha havido necessidade de sedação, pois a técnica é indolor, algumas fêmeas apresentaram leve incômodo durante a manipulação da cérvix para acesso ao útero. Portanto, sempre que possível, devem ser selecionadas cadelas de temperamento calmo e dócil para o emprego da técnica de inseminação intra-uterina transcervical. A seleção da reprodutora permite maximizar o procedimento, em função do alto valor agregado ao sêmen em determinadas situações (importância zootécnica do reprodutor e disponibilidade de uso de seu material genético). Em nosso estudo, uma das fêmeas precisou ser desconsiderada do grupo experimental por possuir cérvix tortuosa, o que impossibilitou o acesso ao útero. Por tais motivos, o exame ginecológico e a tentativa de cateterização cervical prévios à inseminação devem ser adotados como forma de selecionar a reprodutora a ser destinada ao procedimento.

Após as inseminações por endoscopia transcervical, não foi detectada nenhuma alteração uterina. O tempo de canulação da cérvix foi o mínimo possível, apenas o suficiente para a descongelação e avaliação das palhetas de sêmen e a deposição seminal no útero. O tempo para localizar e cateterizar a cérvix variou de 10 minutos até uma hora. Para uma das fêmeas a ser inseminada e posteriormente desconsiderada do grupo experimental, a amostra seminal foi descongelada antes da cateterização cervical. Portanto, até a adequada localização da cérvix, o sêmen permaneceu por 30 minutos a 37°C, havendo morte de 80% dos espermatozóides. Por este motivo, acreditamos que a equipe envolvida deve executar sincronicamente o procedimento, na tentativa de evitar canulação prolongada da cérvix ou detrimento seminal após a descongelação.

*Conclusão*

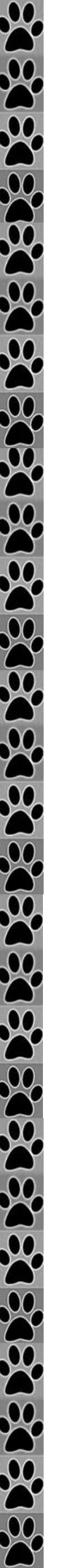


## **8 CONCLUSÃO**

Podemos concluir que:

- A adição de 10 e 20 mM de GSH ao diluidor para criopreservação seminal não promoveu os efeitos protetores esperados na espécie canina, sendo a concentração de 20 mM responsável por maiores prejuízos à amostra seminal.
- A adição de 10 mM de GSH ao diluidor para criopreservação seminal manteve o índice de fertilidade na espécie canina semelhante ao obtido com sêmen criopreservado sem a suplementação antioxidante.

## *Referências*





## REFERÊNCIAS

AITKEN, R. J. Pathophysiology of human spermatozoa. **Current Opinion in Obstetric & Gynecology**, v. 6, p. 128–135, 1984.

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, p. 441–450, 1993.

AITKEN, R. J.; FISHER, H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. **Bioessays**, v. 16, n. 4, p. 259–67, 1994.

AITKEN, R. J. Molecular mechanisms regulating human sperm function. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, n. 3, p. 169–173, 1997.

AITKEN, R. J.; BAKER, M. A.; SAWYER, D. Oxidative stress in the male germ line and its role in the etiology of male infertility and genetic disease. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 7, p. 65–70, 2003.

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

BADINAND, F.; FONTBONNE, A.; MAUREL, S. C.; SILIART, B. Fertilization time in the bitch in relation to plasma concentration of oestradiol, progesterone and luteinizing hormones and vaginal smears. **Journal of Reproduction and Fertility, Supplement**, v. 47, p. 63-67, 1993.

BANSAL, A. K.; BILASPURI, G. S. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. **Veterinary Medicine International**, 2010. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/vmi/2011/686137>>. Acesso em: 25 jun. 2011.

BARBAS, J. P.; MASCARENHAS, R. D. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. **Cell Tissue Bank**, v. 10, p. 49–62, 2009.

BENNETTS, L. E.; AITKEN, R. J. A. Comparative Study of Oxidative DNA Damage in Mammalian Spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 71, p. 77–87, 2005.

BAILEY, J. L.; BILODEAU, J. F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 1-7, 2000.

BILODEAU, J. F.; CHATTERJEE, S.; SIRARD, M. A.; GAGNON, C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, p. 282-288, 2000.

BUCAK, M. N.; ATESSAHIN, A.; YÜCE, A. Effect of antioxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. **Small Ruminant Research**, v. 75, n. 2-3, p. 128–134, 2008.

BUCAK, M. N.; ATESSAHIN, A.; VARISLI, O.; YÜCE, A.; TEKIN, N.; AKCAY, A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen. Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. **Theriogenology**, v. 67, n. 5, p. 1060–1067, 2007.

BUCAK, M. N.; TUNCER, P. B.; SARIOZKAN, S.; BASPINAR, N.; TASPINAR, M.; COYAN, K.; BILGILI, A.; AKALIN, P. P.; BUYUKLEBLEBICI, S.; AYDOS, S.; ILGAZ, S.; SUNGUROGLU A.; OZTUNA D. Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: Antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. **Cryobiology**, v. 61, p. 248–253, 2010.

CONCANNON, P. W.; BATTISTA, M. Canine semen freezing and artificial insemination. In: KIRK, R.W. **Current veterinary therapy- Small animal practice**. Philadelphia: Saunders, 1989. p. 1247-1289.

- CONCANNON, P. W. Reproductive cycles of the domestic bitch. **Animal Reproduction Science**, v. 124, p. 200-210, 2011.
- CREMONESI, F.; SALAMON, L.; GROPPETTI, D.; PECILE, A. Results of a single transcervical endoscopic insemination using frozen in the bitch. **Veterinary Research Communications**, v. 29, p. 187-189, 2005. Supplement 2.
- DONNELLY, E. T.; O'CONNELL, M.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. E. Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 15, p. 1552-1561, 2000.
- DREVET, J. R. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: A complex story. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.250, p. 70–79, 2006
- EDDY, E. M. The spermatozoon. In: NEIL, J. D. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction**, London: Elsevier, 2006. p. 3-54.
- EILTS, B. E. Theoretical aspects of canine semen cryopreservation. **Theriogenology**, v. 64, p. 692-697, 2005.
- ENGLAND, G. C. W.; VERSTEGEN, J. P. Radiographic contrast medium 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.
- FARSTAD, W. Semen cryopreservation in dogs and foxes. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 251–260, 1996.
- FARSTAD, W. Cryopreservation of canine semen – new challenges. **Reproduction in domestic animals**, v. 44, p. 336-341, 2009. Supplement 2.

FATMA, A.; MONIA, R.; HABIB, B. A.; KERKENI, A.; SAAD, A.; AJINA, M. Impact of seminal trace element and glutathione levels on semen quality of Tunisian infertile men. **BMC Urology**, v. 12, n. 6, 2012. (Epub ahead of print).

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

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

GADEA, J.; GUMBAO, D.; MATÁS, C.; ROMAR, R. Supplementation of the thawing media with reduced glutathione improves function and the *in vitro* fertilizing ability of boar spermatozoa after cryopreservation. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 6, p. 749 - 756, 2005.

GADEA, J.; GUMBAO, D.; CÁNOVAS, S.; GARCÍA-VÁZQUEZ, F. A.; GRULLÓN, L. A.; GARDÓN, J. C. Supplementation of the dilution medium after thawing with reduced glutathione improves function and the *in vitro* fertilizing ability of frozen-thawed bull spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 31, p. 40–49, 2007.

GADEA, J.; MOLLA, M.; SELLES, E.; MARCO, M.A.; GARCIA-VAZQUEZ, F.A.; GARDON, J.C. 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, p. 40–46, 2011.

GRIVEAU, J. F.; LE LANNOU, D. Influence of oxygen tension on reactive oxygen species production and human sperm function. **International Journal of Andrology**, v. 20, n. 4, p. 195-200, 1997.

- GRIVEAU, J. F.; DUMONT, E.; RENARD, P.; CALLEGARI, J. P.; LE LANNOU, D. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 103, n. 1, p.17-26, 1995.
- GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R. Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm. **Theriogenology**, v. 63, p. 316-410, 2005.
- IWASAKI, A.; GAGNON, C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. **Fertility and Sterility**, v. 57, n. 2, p. 409-416, 1992.
- JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V. R.; OLSON, P. N. S. **Canine and Feline Theriogenology**. Philadelphia: W. B. Saunders, 2001. 626 p.
- KAWAKAMI, E.; TAKEMURA, A.; SAKUMA, M.; TAKANO, M.; HIRANO, T.; HORI, T.; TSUITSUI, T. Superoxide dismutase and catalase activities in the seminal plasma of normozoospermic and asthenozoospermic beagles. **Journal of Veterinary Medicine and Science**, v. 69, n. 2, p. 133-136, 2007.
- KIM, H. J.; OH, H. J.; JAMG, G.; KIM, M. K. Birth of puppies after intrauterine and intratubal insemination with frozen-thawed canine semen. **Journal of Veterinary Science**, v. 8, n. 1, p. 75-80, 2007.
- LINDE-FORSBERG, C.; FORSBERG, M. Results of 527 controlled artificial inseminations in dogs. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v 47, p.313-323, 1993.
- LINDE-FORSBERG, C.; HOLST, B. S.; GOVETTE, G. Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. **Theriogenology**, v. 52, p. 11-23, 1999.
- MEYERS, S. A. Spermatozoal response to osmotic stress. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 57-64, 2005.

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

MICHAEL, A. J.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E. A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. J.; SARATSIS, P.; VERVERIDIS, H. N.; BOSCO, C. M. Quality and reactive oxygen species of extended canine semen after vitamin C supplementation. **Theriogenology**, v. 70, p. 827–835, 2008.

MONTEIRO, J. C.; GONÇALVES, J. S. A.; RODRIGUES, J. A.; LÚCIO, C. F.; SILVA, L. C. G.; ASSUMPCÃO, M. E. O. A.; VANNUCCHI, C. I. Influence of ascorbic acid and glutathione antioxidants on frozen-thawed canine semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 359-362, 2009.

NICHI, M.; GOOVAERTS, I. G.; CORTADA, C. N.; BARNABE, V. H.; DE CLERCQ, J. B.; BOLS, P. E. 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**, v. 67, n. 2, p. 334-340, 2007.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

ORTEGA, A. M.; IZQUIERDO, A. C.; GÓMEZ, J. J. H.; CORICHI, I. M. O.; TORRES, V. M. M.; MÉNDEZ, J. J. V. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen: una revisión. **Interciencia**, v. 28, p. 699-704, 2003.

PEÑA, A. I.; BARRIO, F.; QUINTELA, L. A.; HERRADÓN, P. G. Effect of different glycerol treatments on frozen-thawed dog sperm longevity and acrosomal integrity. **Theriogenology**, v. 50, n. 1, p. 163-74, 1998.

PERUMAL, P.; SELVARAJU, S.; SELVAKUMAR, S.; BARIK, A. K.; MOHANTY, D. N.; DAS, S., DAS, R. K.; MISHRA, P. C. Effect of pre-freeze addition of cysteine hydrochloride

and reduced glutathione in semen of crossbred Jersey bulls on sperm parameters and conception rates. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 4, p. 636-41, 2011.

PRETZER, S. D.; LILLICH, R. K.; ALTHOUSE, G. C. Single, transcevicinal insemination using frozen-thawed semen in the Greyhound: a case series study. **Theriogenology**, v. 65, p. 1029-1036, 2006.

ROTA, A.; IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J.; LINDE-FORSBERG, C. Fertility after vaginal or uterine deposition of dog semen frozen in a tris extender with or without Equex STM paste. **Theriogenology**, v. 51, n. 6, p. 1045-1058, 1999.

ROTA, A.; ROTA, A.; MARTINE, M.; MILANI, C.; ROMAGNOLI, S. Evaluation of dog semen quality after slow (biological freezer) or rapid (nitrogen vapours) freezing. **Reproduction, Nutrition, Development**, v. 45, p. 29–37, 2005.

ROVER JÚNIOR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathiona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

SAKKAS, D.; MOFFATT, O.; MANICARDI, G.C.; MARIETHOZ, E.; TAROZZI, N.; BIZZARO, D. Nature of DNA damage in ejaculate human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 4, p. 1061-1067, 2002.

SALEH, R. A.; AGARWAL, A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 6, p. 737-752, 2002.

SEAGER, S. W. J. Artificial insemination in dogs. In: BURKE, T.J. **Small animal reproduction and infertility**: a clinical approach to diagnosis and treatment. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986. p. 207-217.

SHARMA, R. K.; AGARWA, L. A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, v. 48, n. 6, p. 835-850, 1996.

SILVA, L. D.; ONCLIN, K.; LEJEUNE, B.; VERSTEGEN, J. P. Comparisons of intravaginal and uterine insemination of bitches with fresh or frozen semen. **The Veterinary Record**, v. 138, p. 154-157, 1996.

SIMÕES, R. **Influência da fragmentação de DNA espermático na produção *in vitro* de embriões bovinos**. 2010. 105 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

STRADAIOLI, G.; NORO, T.; SYLLA, L.; MONACI, M. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: Comparison between two extenders. **Theriogenology**, v. 67, p. 1249–1255, 2007.

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

THOMASSEN, R.; SANSON, G.; KROGENAES, A.; FOUIGNER, J. A.; BERG, K. A.; FARSTAD, W. Artificial insemination with frozen semen in dogs: a retrospective study of 10 years using a non-surgical approach. **Theriogenology**, v. 66, n. 6-7, p. 1645-1650, 2006.

THOMSON, L. K.; FLEMING, S. D.; AITKEN, R. J.; DE IULIS, G. N.; ZIESCHANG, J. A.; CLARK, A. M. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. **Human Reproduction**, v. 24, p. 2061–2070, 2009.

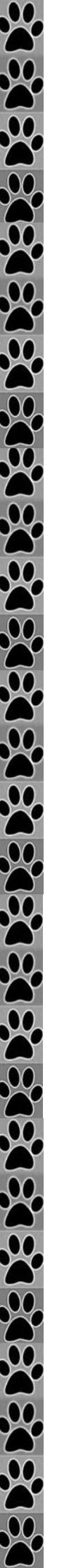
TROIANO, L.; GRANATA, A. R.; COSSARIZZA, A.; KALASHNIKOVA, G.; BIANCHI, R.; PINI, G.; TROPEA, F.; CARANI, C.; FRANCESCHI, C. Mitochondrial membrane potential and DNA stainability in human sperm cells: a flow cytometry analysis with implications for male infertility. **Experimental Cell Research**, v. 241, p. 384-393, 1998.

TSUITSUI, T.; HASE, M.; TANAKA, A.; FUJIMURA, N.; HORI, T.; KAWAKAMI, E. Intrauterine and intravaginal insemination with frozen canine semen using an extender consisting of ovus ES paste-supplemented egg yolk tris-fructose citrate. **Journal of Medicine Veterinary Science**, v. 62, p. 603-606, 2000.



- TSUITSUI, T.; TAKAHASHI, F.; HORI, T.; KAWAKAMI, E.; CONCANNON P.W. Prolonged duration of fertility of dog ova. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 230-233, 2009.
- TVRDÁ, E.; KNAZICKÁ, Z.; BÁRDOS, L.; MASSÁNYI, P.; LUKÁC, N. Impact of oxidative stress on male fertility – a review. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 59, n. 4, p. 465–484, 2011.
- VALENÇA, R. M. B.; GUERRA, M. M. P. Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 1, p. 47-53, 2007.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 149-179, 2002.
- WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 871-891, 1995.
- WATSON, P. F. The causes of reduced fertility of cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 61, p. 481-492, 2000.
- WILSON, M. S. Transcervical insemination techniques in the bitch. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 31, n. 2, p. 291-304, 2001.
- YU, I.; SONGSASEN, N.; GODKE, R.; LEIBO, S. P. Differences among dogs in response of their spermatozoa to cryopreservation using various cooling and warming rates. **Cryobiology**, v. 44, p. 62-78, 2002.
- ZINI, A.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. **International Journal of Andrology**, v. 16, n. 3, p. 183-188, 1993.

# *Anexos*



## ANEXO A

## FRAÇÃO A

REAGENTE	50 mL
Tris-hidroxi-metil-aminometano (T-6791)	1,5934 g
Ácido cítrico mono-hidratado (C-1909)	0,89 g
D-Frutose (F-2543)	0,568 g
Gema de ovo	10 mL
Água destilada	40 mL
Gentamicina (G-1264)	250 µL
Glutationa (G-4251) – 10 mM	0,1536 g
Glutationa (G-4251) – 20 mM	0,3072 g

## ANEXO B

## FRAÇÃO B

REAGENTE	50 mL
Tris-hidroxi-metil-aminometano (T-6791)	1,5934 g
Ácido cítrico mono-hidratado (C-1909)	0,89 g
D-Frutose (F-2543)	0,568 g
Gema de ovo	10 mL
Glicerol	5 mL
Água destilada	35 mL
Gentamicina (G-1264)	250 $\mu$ L
Glutationa (G-4251) – 10mM	0,1536 g
Glutationa (G-4251) – 20mM	0,3072 g