

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINE TOMASI BORTOLETO

ADIÇÃO DA SUPERÓXIDO DISMUTASE E DO ÁCIDO ASCÓRBICO COMO
ANTIOXIDANTES AO DILUENTE OPTIXCELL® NA CRIOPRESERVAÇÃO DE
SÊMEN BOVINO

CURITIBA

2020

CAROLINE TOMASI BORTOLETO

ADIÇÃO DA SUPERÓXIDO DISMUTASE E DO ÁCIDO ASCÓRBICO COMO
ANTIOXIDANTES AO DILUENTE OPTIXCELL® NA CRIOPRESERVAÇÃO DE
SÊMEN BOVINO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Biologia Integrada, departamento de Medicina Veterinária, Setor Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Romildo Romualdo Weiss.

CURITIBA

2020

Bortoleto, Caroline Tomasi

Adição da superóxido dismutase e do ácido ascórbico como antioxidantes ao diluente Optixcell® na criopreservação de sêmen bovino. / Caroline Tomasi Bortoleto. - Curitiba, 2020.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Orientador: Romildo Romualdo Weiss.

1. Criopreservação. 2. Bovinos - Sêmen. 3. Antioxidantes. I. Weiss, Romildo Romualdo. II. Título. III. Universidade Federal do Paraná.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS - 40001016023P3

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **CAROLINE TOMASI BORTOLETO** intitulada: **ADIÇÃO DA SUPERÓXIDO DISMUTASE E DO ÁCIDO ASCÓRBICO COMO ANTIOXIDANTES AO DILUENTE OPTIXCELL NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN BOVINO**, sob orientação do Prof. Dr. ROMILDO ROMUALDO WEISS, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 22 de Maio de 2020.

Assinatura Eletrônica

25/05/2020 13:56:44.0

ROMILDO ROMUALDO WEISS

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

25/05/2020 15:35:06.0

TÁCIA GOMES BERGSTEIN GALAN

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE POSITIVO)

Assinatura Eletrônica

25/05/2020 17:45:41.0

LUIZ ERNANDES KOZICKI

Avaliador Externo (PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ)

RUA DOS FUNCIONÁRIOS, 1540 - CURITIBA - Paraná - Brasil
CEP 80035050 - Tel: (41) 3350-5621 - E-mail: ppgcv.ufpr@gmail.com

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 42104

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.pppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinatura.jsp>
e insira o código 42104

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Rosaura e Gilberto, por terem sempre me apoiado em todas as minhas decisões, por sempre estarem por perto quando eu precisei, por terem fornecido toda a assistência para eu estar aqui hoje, e principalmente, por acreditarem em mim.

Aos meus irmãos, Emmyline e Diego, e aos meus cunhados, Letícia e Eduardo, por terem sido meu exemplo de pessoas e profissionais. Espero um dia ser metade do que vocês são. Eu amo muito vocês.

Ao meu namorado, Kaio, por ter ficado sempre ao meu lado, por ser meu amigo e me escutar sempre que eu precisei, e por toda ajuda e compreensão durante esse período.

À minha cadela Shakira por ter feito eu querer ser e me apaixonar por essa profissão maravilhosa, aos seis anos de idade. E às minhas pequenas Jolie e Arya por fazerem meus dias muito mais felizes.

Ao meu amigo estrangeiro, Jorge, que foi muito mais que só um colega de mestrado, mas se tornou um amigo e um irmão. Obrigada por tudo que você me ensinou, por todas as conversas e cafés da manhã.

Aos meus amigos que conheci durante o mestrado, Luciana, Laís e Pedro, que foram excepcionais para suportar os momentos difíceis do mestrado, por escutarem os desabafos, as reclamações, e as choradeiras. Amo muito vocês.

Ao meu orientador, Romildo, por ter me dado essa oportunidade, por me ensinar muito sobre a reprodução, e por sempre querer fazer com que aprendesse coisas novas.

Aos professores Juliana, Ivan Deconto e Gilson (UFSM), que me ajudaram no desenvolvimento do meu projeto e a conseguir lugar para a realização do projeto.

Às colegas de profissão, Tácia e Ana Cláudia, que sempre estiveram disponíveis para retirar minhas dúvidas, no desenvolvimento do projeto e me ajudaram sempre que eu precisei.

Aos médicos veterinários da Central de Reprodução Renascer, Cecília, Mayara e Inayá, que cederam o local e os animais para a realização do projeto, que me auxiliaram na metodologia e análise do projeto. Obrigada pelo carinho de vocês.

À professora Francielli e ao pessoal do Laboratório de Bioquímica da Unipampa, que forneceram seu tempo e me ajudaram com todas as análises bioquímicas do projeto.

À Capes, pelo auxílio financeiro.

“Expecting perfection, leaves a lot to ignore.

When the past is the present

and the future’s no more.”

Dance of the Clairvoyants – Pearl Jam

RESUMO

O processo de criopreservação do sêmen submete os espermatozoides a um grande estresse celular, expondo-os a condições desfavoráveis que dificultam a manutenção da sua viabilidade. Ainda, essas células também sofrem estresse oxidativo, caracterizado pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), que ocasiona a peroxidação lipídica, reduzindo a viabilidade espermática. Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo testar dois antioxidantes importantes para o controle da geração de ROS, a superóxido dismutase e o ácido ascórbico. Esse trabalho foi dividido em dois capítulos, sendo o primeiro composto por uma revisão bibliográfica sobre estresse oxidativo no sêmen criopreservado bovino e o segundo abordando o experimento realizado para avaliação da ação dos antioxidantes ácido ascórbico e superóxido dismutase após a criopreservação do sêmen bovino. Para o experimento, foram utilizados cinco touros, previamente condicionados a coleta de sêmen. Foram realizadas cinco coletas, com intervalo de dois dias, e em cada uma, forma-se um *pool* de sêmen (5 *pools*). Após cada coleta, os *pools* foram divididos em cinco grupos de tratamento: GC (sem adição de antioxidantes), GAC I (adição 4,5 mg/mL de ácido ascórbico), GAC II (adição de 6,5 mg/mL de ácido ascórbico), GSOD I (adição de 250 U/mL de superóxido dismutase) e GSOD II (adição de 500 U/mL de superóxido dismutase), para depois serem criopreservados e mantidos em botijão criogênica a -196°C. Realizou-se a avaliação dos parâmetros espermáticos (MT, MP, VAP, VCL, VSL, LIN, STR e ALH), da integridade de membrana (teste hiposmótico) e morfologia espermática (método formol-salina). Ainda, realizou-se avaliações bioquímicas do sêmen, como o potencial antioxidante (FRAP), o teste ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a medição das ROS. Após avaliação, constatou-se que a MT foi reduzida nos grupos AC I e SOD II. Do mesmo modo, o GSOD II proporcionou redução significativa da MP. Já os parâmetros de VCL e ALH, o GSOD I foi o que demonstrou melhores resultados, e a adição de ácido ascórbico (GAC I e GAC II) reduziu esses valores, quando comparado ao GC. Com relação a LIN e STR, o GAC II demonstrou melhorar esses parâmetros e, em contrapartida, o GSOD I reduziu a LIN e STR, em relação ao GC. Porém, a adição de ácido ascórbico na dose de 6,5 mg/mL (GAC II) aumentou a peroxidação lipídica da membrana espermática, e a adição de SOD na dose de 250 U/mL (GSOD I) reduziu esse estresse oxidativo. Ainda, o ácido ascórbico em ambas doses demonstrou melhor potencial antioxidante, quando comparado aos outros grupos.

Palavras-chave: criopreservação, parâmetros espermáticos, espécies reativas de oxigênio, antioxidante

ABSTRACT

The semen cryopreservation process submits sperm to great cellular stress, exposing them to unfavorable conditions that make it difficult to maintain their viability. Still, the cells also suffer oxidative stress, characterized by the generation of reactive oxygen species (ROS), which causes lipid peroxidation, reducing sperm viability. Thus, the present study aimed to test two important antioxidants for controlling ROS generation, superoxide dismutase and ascorbic acid. This work was divided into two chapters, the first consisting of a bibliographic review on oxidative stress in cryopreserved bovine semen and the second addressing the experiment carried out to evaluate the action of the antioxidants ascorbic acid and superoxide dismutase after the cryopreservation of bovine semen. For the experiment, five bulls were used, previously conditioned to semen collection. Five collections were carried out, with an interval of two days, and in each one, a semen *pool* is formed (5 *pools*). After each collection, the *pools* were divided into five treatment groups: CG (without adding antioxidants), ACG I (adding 4.5 mg/mL of ascorbic acid), ACG II (adding 6.5 mg/mL of ascorbic acid), SODG I (adding 250 U/mL of superoxide dismutase) and SODG II (adding 500 U/mL of superoxide dismutase), to then be cryopreserved and kept in a cryogenic cylinder at -196°C. Sperm parameters (TM, PM, VAP, VCL, VSL, LIN, STR and ALH), membrane integrity (hyposmotic test) and sperm morphology (formalin-saline method) were evaluated. In addition, biochemical evaluations of the semen were performed, such as the antioxidant potential (FRAP), the thiobarbituric acid test (TBARS) and the measurement of ROS. After evaluation, it was found that TM was reduced in the ACG I and SODG II groups. Likewise, SODG II provided a significant reduction in PM. The parameters of VCL and ALH, SODG I showed the best results, and the addition of ascorbic acid (ACG I and ACG II) reduced these values, when compared to CG. With regard to LIN and STR, ACG II demonstrated to improve these parameters and, in contrast, SODG I reduced LIN and STR, in relation to CG. However, the addition of ascorbic acid at a dose of 6.5 mg/mL (ACG II) increased the lipid peroxidation of the sperm membrane, and the addition of SOD at a dose of 250 U/mL (SODG I) reduced this oxidative stress. Still, ascorbic acid in both doses showed better antioxidant potential, when compared to the other groups.

Key words: cryopreservation, sperm parameters, reactive oxygen species, antioxidant

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO II

FIGURA 1 – DIAGRAMA DO ESTUDO EXECUTADO COM SÊMEN DE TOUROS DA RAÇA ALBERDEEN ANGUS.....	47
---	-----------

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

TABELA 1 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA MOTILIDADE TOTAL (MT), AMPLITUDE DE DESLOCAMENTO DE CABEÇA (ALH), VELOCIDADE TOTAL (VCL), RETILINEARIDADE (STR) E LINEARIDADE (LIN) NOS GRUPOS CONTROLE (GC), GRUPO ÁCIDO ASCÓRBICO I (GAC I), GRUPO ÁCIDO ASCÓRBICO II (GAC II), GRUPO SUPERÓXIDO DISMUTASE I (GSOD I) E GRUPO SUPERÓXIDO DISMUTASE II (GSOD II) NO SÊMEN DE TOUROS DA RAÇA ALBERDEEN ANGUS.....51

TABELA 2 - MÉDIA E DESVIO PADRÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE (FRAP), DO NÍVEL DE MDA (TBARS) E DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS), NOS GRUPOS CONTROLE (GC), GRUPO ÁCIDO ASCÓRBICO I (GAC I), GRUPO ÁCIDO ASCÓRBICO II (GAC II), GRUPO SUPERÓXIDO DISMUTASE I (GSOD I) E GRUPO SUPERÓXIDO DISMUTASE II (GSOD II) NO SÊMEN DE TOUROS DA RAÇA ALBERDEEN ANGUS.....53

TABELA 3 - MEDIANA E IQR DA MOTILIDADE PROGRESSIVA (MP), MORFOLOGIA ESPERMÁTICA (ME), INTEGRIDADE DE MEMBRANA (HOST) E VELOCIDADE MÉDIA DE PERCURSO (VAP) NOS GRUPO CONTROLE (GC), GRUPO ÁCIDO ASCÓRBICO I (GAC I), GRUPO ÁCIDO ASCÓRBICO II (GAC II), GRUPO SUPERÓXIDO DISMUTASE I (GSOD I) E GRUPO SUPERÓXIDO DISMUTASE II (GSOD II) NO SÊMEN DE TOUROS DA RAÇA ALBERDEEN ANGUS.....54

LISTA DE SIGLAS

GC – grupo controle

MT – motilidade total

MP – motilidade progressiva

VCL – velocidade curvilínea

VAP – velocidade média

ALH – amplitude de deslocamento lateral da cabeça

STR – retilinearidade

LIN – linearidade

FRAP – potencial antioxidante redutor férrico

HOST – teste hiposmótico

ME – morfologia espermática

ROS – espécies reativas de oxigênio

°C – graus Celsius

mM – milimolar

μM – micromolar

ml – mililitro

mg - miligrama

pH – potencial hidrogênio iônico

O₂⁻ - superóxido

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

OH⁻ - hidroxila

DNA – ácido desoxirribonucleico

MDA – malondialdeído

TBARS - teste espectrofotômetro do ácido tiobarbitúrico

GSH – glutationa redutase

GSH-Px – glutationa peroxidase

CAT – catalase

SOD – superóxido dismutase

AC – ácido ascórbico

UF – unidade de fluorescência

µg – micrograma

µm/s – micrometro por segundo

DMSO - dimetilsulfóxido

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
2.1 Objetivos gerais.....	17
2.1 Objetivos específicos.....	17
3. JUSTIFICATIVA	17
4. CAPÍTULO I – ESTRESSE OXIDATIVO NO SÊMEN CRIOPRESERVADO BOVINO – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
4.1 Introdução.....	19
4.2 Desenvolvimento.....	20
4.2.1 Criopreservação do sêmen.....	20
4.2.2 Diluente para sêmen bovino congelado.....	21
4.2.3 Produção de espécies reativas de oxigênio no sêmen e o estresse oxidativo.....	24
4.2.4 Utilização de antioxidantes no meio diluidor do sêmen.....	27
4.2.5 Superóxido dismutase.....	28
4.2.6 Ácido ascórbico.....	28
4.3 Conclusão.....	29
4.4 Referências.....	30
5. CAPÍTULO II – ADIÇÃO DA SUPERÓXIDO DISMUTASE E DO ÁCIDO ASCÓRBICO AO DILUENTE OPTIXCELL NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN BOVINO	43
RESUMO.....	43
ABSTRACT.....	44
5.1 Introdução.....	45
5.2 Material e métodos.....	46
5.2.1 Coleta de sêmen.....	47
5.2.2 Processamento do sêmen.....	47
5.2.3 Sistema Computadorizado de Análise Espermática (Casa – Computer Assisted Sperm Analysis).....	48
5.2.4 Avaliação da integridade da membrana plasmática (Teste Hiposmótico).....	48
5.2.5 Avaliação da morfologia espermática.....	49
5.2.6 Mensuração da peroxidação lipídica.....	49
5.2.7 Mensuração dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS).....	50

5.2.8 Potencial antioxidante redutor férrico (FRAP).....	50
5.3 Análise Estatística.....	50
5.4 Resultados.....	51
5.5 Discussão.....	54
5.6 Conclusões.....	58
5.7 Referências.....	59
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65
7. REFERÊNCIAS.....	66
8. ANEXO 1 – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	83

1. INTRODUÇÃO

Dentre as técnicas da biotecnologia da reprodução aplicadas em rebanhos bovinos, destaca-se a técnica de inseminação artificial, que apresenta maiores vantagens quando comparada à utilização da monta natural. Essa biotecnologia proporciona benefícios, como o melhoramento genético do rebanho em menor período, controle de enfermidades transmitidas por via sexual, geração de maior número de descendentes de um reprodutor, padronização do rebanho, e a possibilidade de estocagem do sêmen de um ótimo reprodutor (BORGES et al., 2011).

Para a sua realização, é necessário que o sêmen congelado seja de boa qualidade. Porém, o congelamento e o posterior descongelamento do sêmen, acarretam inúmeros danos aos espermatozoides (AMANN & PICKETT, 1987; WATSON, 1995). Esse processo de criopreservação do sêmen expõe as células espermáticas a condições adversas, gerando um grande estresse celular para a manutenção da sua viabilidade (PURDY, 2006).

O estresse celular envolve principalmente os efeitos do choque térmico e do estresse oxidativo. O choque térmico pode provocar redução progressiva e irreversível da motilidade espermática, além de alterações bioquímicas e na função dessas células (WATSON, 2000). Já o estresse oxidativo é ocasionado pelo desequilíbrio das espécies reativas de oxigênio – também conhecidas como radicais livres – e dos antioxidantes ali presentes (ANDRADE et al., 2010).

No plasma seminal e nos espermatozoides existe a produção de substâncias antioxidantes, enzimáticas ou não enzimáticas, capazes de neutralizar os efeitos deletérios gerados pelas espécies reativas de oxigênio (AGARWAL et al., 2005). Porém, esse sistema antioxidante é reduzido durante a diferenciação espermática nos epididimos, prejudicando a capacidade antioxidante dessas células após o processo de criopreservação (STOREY, 1997).

Portanto, para que seja possível a manutenção da integridade da membrana dos espermatozoides, do seu conteúdo genético e, conseqüentemente, de sua viabilidade, existem estudos que avaliam o acréscimo de antioxidantes, naturais e sintéticos, aos meios diluidores, a fim de

tentar reduzir o estresse oxidativo e a produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio (BORGES et al., 2011).

Assim, são necessários mais estudos para a avaliação da adição desses antioxidantes no meio diluidor do sêmen, para verificar se é possível, através destes, reduzir a peroxidação lipídica, e conseqüentemente, os danos ocasionados aos espermatozoides.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito de antioxidantes, enzimático e sintético, no meio diluidor comercial Optixcell®, através da verificação da viabilidade espermática do sêmen, após sua criopreservação.

2.2. Objetivos específicos

Realizar a avaliação microscópica (motilidade total e progressiva, velocidade total, velocidade média, velocidade retilínea, retilinearidade, linearidade e amplitude de deslocamento lateral da cabeça), e avaliação bioquímica (potencial antioxidante, mensuração de peroxidação lipídica e das espécies reativas de oxigênio) do sêmen bovino criopreservado após a adição de antioxidantes ao meio diluidor comercial Optixcell®.

3. JUSTIFICATIVA

A criopreservação do sêmen é um procedimento importante para a manutenção da sua viabilidade por maior período, após sua coleta. Porém, devido a vários fatores envolvidos nesse processo, os espermatozoides ficam susceptíveis e frágeis, devendo-se promover meios com substâncias adequadas, como antioxidantes, para minimizar os efeitos adversos da criopreservação, e preservar a capacidade fertilizante dessas células.

4. CAPÍTULO I

ESTRESSE OXIDATIVO NO SÊMEN CRIOPRESERVADO BOVINO – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Oxidative stress in bovine cryopreserved semen – review

RESUMO

Este trabalho tem como objetivo abordar os efeitos ocasionados pelo estresse oxidativo no sêmen, que ocorre durante o processo de criopreservação. A criopreservação ocasiona estresse oxidativo nas células espermáticas, através da produção das espécies reativas de oxigênio (ROS), que proporciona efeitos deletérios às células espermáticas, prejudicando a manutenção da sua viabilidade. Assim, testa-se a adição de antioxidantes nos meios extensores utilizados na criopreservação espermática, objetivando reduzir a produção dessas moléculas, e melhorar sua capacidade de sobrevivência e fertilização.

Palavras-chave: criopreservação, sêmen, espécies reativas de oxigênio

ABSTRACT

This work aims to address the effects caused by oxidative stress in semen, which occurs during the cryopreservation process. Cryopreservation causes oxidative stress in sperm cells, through the production of reactive oxygen species (ROS), which provides harmful effects to sperm cells, impairing the maintenance of their viability. Thus, the addition of antioxidants in the extender media used in sperm cryopreservation is tested, aiming to reduce the production of these molecules, and improve their ability to survive and fertilize.

Key words: cryopreservation, semen, reactive oxygen species

4.1. INTRODUÇÃO

A inseminação artificial é uma biotecnologia da reprodução, que possui vantagens quando comparada à utilização da monta natural. O melhoramento genético do rebanho em menor período, controle da transmissão venérea de enfermidades, geração de maior número de descendentes de um reprodutor, padronização do rebanho, e a possibilidade de estocagem do sêmen de um ótimo reprodutor são algumas das vantagens obtidas quando se opta pela utilização da técnica (BORGES et al., 2011).

A utilização da inseminação artificial tornou necessário o melhoramento da qualidade do sêmen criopreservado. Afinal, esse processo ainda ocasiona inúmeros danos aos espermatozoides (AMANN & PICKETT, 1987; WATSON, 1995), uma vez que o processo submete os espermatozoides a condições adversas, gerando um grande estresse celular para a manutenção da sua viabilidade (PURDY, 2006).

O estresse celular envolve principalmente os efeitos do choque térmico e do estresse oxidativo. O choque térmico provoca redução progressiva e irreversível da motilidade espermática, além de alterações bioquímicas e na função dessas células (WATSON, 2000). Já o estresse oxidativo é uma consequência relacionada ao aumento de danos celulares induzidos pelo oxigênio, e oxidantes derivados do oxigênio, conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ROS) (SIKKA et al., 1995).

Os ROS são formados de maneira contínua e excessiva durante o processo de criopreservação, tornando-se prejudiciais aos espermatozoides, uma vez que induzem a peroxidação lipídica, apoptose, danos ao DNA e redução da qualidade espermática (CASTRO, 2014). Para neutralizar esses efeitos deletérios, o plasma seminal e os espermatozoides produzem substâncias antioxidantes (AGARWAL et al., 2005), que podem ser enzimáticas ou não enzimáticas. Porém, esse sistema antioxidante é reduzido durante a diferenciação espermática nos epidídimos, prejudicando a capacidade antioxidante dessas células (STOREY, 1997).

Pretendendo-se simular a ação dos antioxidantes presentes no sêmen, existem estudos avaliando o acréscimo de antioxidantes, naturais e sintéticos, aos meios extensores (BORGES et al., 2011).

A vitamina E ou α -tocoferol e a enzima superóxido dismutase são os principais antioxidantes avaliados nos estudos com sêmen bovino. O'FLAHERTY et al. (1997) relataram que a adição de vitamina E ao meio diluidor do sêmen não apresentou modificação nos valores de motilidade e na capacitação espermática. Já a superóxido dismutase ocasionou redução na capacitação espermática.

Em outro estudo a adição da enzima superóxido dismutase e glutatona ao meio diluidor, demonstrou uma correlação positiva com a motilidade e viabilidade espermática, e uma correlação negativa com a mensuração da peroxidação lipídica, observada pela avaliação da integridade da membrana dos espermatozoides (NAIR et al., 2006).

Em um estudo realizado em cães, testaram-se seis antioxidantes: ácido ascórbico (vitamina C), acetilcisteína, taurina, catalase, α -tocoferol (vitamina E) e a vitamina B16. Relatou-se que a adição da catalase no meio diluidor, quando comparado com os outros grupos testados, foi o antioxidante mais eficaz em melhorar a qualidade dos parâmetros espermáticos analisados. Seguiu-se com melhores valores os antioxidantes acetilcisteína e taurina, que protegeram os espermatozoides do estresse oxidativo de maneira indireta, ou seja, sem eliminar a presença das substâncias reativas de oxigênio. Ainda, relatou-se que a vitamina E não demonstrou efeito positivo como antioxidante, porém isso já era esperado, pois o α -tocoferol não interfere na geração dessas substâncias. A vitamina C não influenciou nos parâmetros analisados, mantendo a qualidade espermática igual ao sêmen fresco (MICHAEL et al., 2007).

Assim, são necessários mais estudos para a avaliação da adição desses antioxidantes no meio diluidor do sêmen, para verificar se é possível, através destes, reduzir a peroxidação lipídica, e conseqüentemente, os danos ocasionados aos espermatozoides.

4.2. DESENVOLVIMENTO

4.2.1. Criopreservação do sêmen

Para tornar possível a utilização das biotecnologias da reprodução, como a inseminação artificial em tempo fixo e a produção e transferência de embriões, foi necessário o desenvolvimento de um processo para a preservação

da função espermática após sua coleta. Esse método produzirá quantidades suficientes de espermatozoides viáveis, para que ocorra a fecundação dos oócitos das fêmeas sincronizadas (BORGES et al., 2011).

Esse processo é conhecido como congelação do sêmen, que torna possível a utilização do sêmen coletado de reprodutores por período indeterminado devido à congelação (PURDY, 2006). Ainda, esse processo amplia as vantagens da inseminação artificial, permitindo o transporte do sêmen por longas distâncias e a utilização do sêmen de um reprodutor geneticamente superior, mesmo após a sua morte (BAILEY et al., 2000). Porém, esse processo submete os espermatozoides a um grande estresse celular, expondo-os a condições desfavoráveis para que seja possível manter sua viabilidade (PURDY, 2006).

O estresse celular provocado nos espermatozoides durante esse processo é decorrente do choque térmico ao qual são submetidos. Os efeitos observados são decorrentes de alterações bioquímicas na membrana plasmática dos espermatozoides (WATSON, 2000). Por este motivo, ocorre redução da viabilidade espermática por interferir diretamente na motilidade e na integridade de membrana dessas células (BUCAK et al., 2010), além de prejuízos na habilidade do espermatozoide em realizar a reação acrossomal (BAILEY et al., 2000).

Na tentativa de reduzir esses danos ocasionados pela criopreservação, são utilizados meios diluidores, que preservarão a motilidade e a integridade da membrana plasmática. Esses meios possuem substâncias que neutralizam o pH, mantêm o equilíbrio eletrolítico e a pressão osmótica, atuam como fonte de energia, como crioprotetores e, ainda, inibem o crescimento bacteriano (AMANN & PICKETT, 1987).

4.2.2. Diluente para sêmen bovino congelado

A adição de meios extensores para o processo de criopreservação do sêmen tem como principal finalidade promover energia para a movimentação dos espermatozoides, protegê-los contra as mudanças drásticas de temperatura impostas, e fornecer um ambiente adequado para sobreviverem temporariamente (PURDY, 2006). Para isso, o meio extensor apresentará pH e

osmolaridade adequados, e possuirá efeito crioprotetor para as células espermáticas (SALAMON & MAXWELL, 2000).

Os meios extensores são compostos por crioprotetores, que protegem as células espermáticas contra danos causados pela desidratação e choque térmico durante o processo de criopreservação (MEDEIROS, 2003). A gema de ovo, assim como o leite, são crioprotetores não permeáveis, que agem extracelularmente (AISEN et al., 2000), através da inibição da formação de gelo no meio extracelular (KUNDU et al., 2002). A gema de ovo é considerada a substância com maior eficiência na proteção extracelular dos espermatozoides, demonstrando melhores resultados nas funções espermáticas e preservação da fertilidade, quando comparado a meio diluidores sem adição desse componente (SNOECK et al., 2007).

Como crioprotetores permeáveis, existe o glicerol (AMANN & PICKETT, 1987), o etilenoglicol (BITTENCOURT et al., 2004), e o dimetilsulfóxido (DMSO) (FICKEL et al., 2007), que melhoram a desidratação das células espermáticas quando submetidas a baixas temperaturas, equilibrando com o meio extracelular (PURDY, 2006), e reduzem a formação de gelo intracelular, resultando em uma melhor taxa de sobrevivência dos espermatozoides ao processo de criopreservação (HOLT, 2000).

É necessário também a presença de açúcares, como a frutose, sacarose e glicose, que interagem com os fosfolípidios encontrados na membrana plasmática da célula espermática, aumentando a sobrevivência das mesmas (AISEN et al., 2000). Adiciona-se também sais como o citrato de sódio ou ácido cítrico, como substâncias tampões, além da adição de agentes antimicrobianos, como penicilina, estreptomicina e gentamicina, para controlar ou evitar o crescimento bacteriano no meio (FERREIRA et al., 2005).

Muitos meios diluidores foram desenvolvidos no intuito de preservar a viabilidade dos espermatozoides após os processos de refrigeração e criopreservação. Na espécie bovina e ovina, o mais utilizado é o meio “egg yolk tris” (“tris-gema”) (PURDY, 2006), uma vez que o mesmo já obteve eficácia comprovada para os efeitos crioprotetores, quando comparado a outros meios desenvolvidos. Isso foi demonstrado por THUN et al (2002) que, ao comparar a utilização do meio tris-gema com o meio Biociphos-Plus®, observou que o sêmen congelado bovino diluído com o meio extensor tris-gema obteve uma

melhor motilidade total, além dos espermatozoides apresentarem uma menor taxa de anormalidades.

Isso foi demonstrado também por DORADO et al. (2007), quando comparou a utilização do extensor tris-gema com o extensor a base de leite desnatado em sêmen caprino. Os resultados do estudo constataram que o meio tris-gema promoveu uma melhor preservação da motilidade total, porém apresentou uma menor integridade da membrana acrossomal.

A gema de ovo, quando utilizada na formação do diluente, permite a redução da concentração do glicerol (SNOECK et al., 2007), que adicionado em altas concentrações, poderá ser tóxico para as células espermáticas (GLAZAR et al., 2009).

Porém, os compostos de origem animal, como a gema de ovo, estão sendo limitados em alguns países, devido aos riscos imunológicos e microbiológicos (STRADAIOLI et al., 2007), e à presença de alguns componentes como lipoproteínas de alta densidade (HDLs) (PACE & GRAHAM, 1974) e hormônios (LIPAR et al., 1999). Além da dificuldade de padronização do diluente (STRADAIOLI et al., 2007), pela variação na composição da gema de ovo, dependendo do híbrido selecionado, manejo e nutrição dos animais (BATHGATE et al., 2006).

Além das preocupações sanitárias, a gema de ovo pode alterar a integridade estrutural e funcional das células espermáticas após o descongelamento das amostras (PUGLIESI et al., 2012). Foi demonstrado também que a gema de ovo interfere negativamente na respiração e motilidade das células espermáticas, e pode interferir na avaliação microscópica do sêmen devido à presença de glóbulos de gordura (GLAZAR et al., 2009).

Procurando-se alternativas para esses problemas, estudos estão sendo realizados para desenvolver diluentes livres de produtos de origem animal (SILVA, 2017). Lipoproteínas de baixa densidade (LDLs) extraídas da própria gema de ovo, obtiveram resultados eficientes no sêmen de búfalos, quando comparados ao meio tris-gema (AKHTER et al., 2011). Essas LDLs protegem a células espermática através da formação de camada protetora, que substitui a membrana fosfolipídica que se danifica durante o processo de criopreservação (FOULKES et al., 1980; QUINN et al., 1980; GRAHAM & FOOTE, 1987).

Também, foram desenvolvidos diluentes a base de lecitina, que é extraída de grãos de soja, sendo composta por fosfolipídeos, triglicerídeos e outras substâncias derivadas do óleo (SEIDMAN et al., 2002). Foi demonstrado que os diluentes acrescidos por essa substância, como Andromed® e o Bioxcell® (MUINO et al., 2007), acarretam em menor eficiência na criopreservação do sêmen bovino (FOROUZANFAR et al., 2010).

Porém, estudos testam a utilização de lipídios que apresentam lipossomas compostos por moléculas conhecidas. Sua atividade é atribuída às moléculas de lipídios e colesterol, que agem na membrana fosfolipídica (GRAHAM et al., 1987). O meio extensor Optixcell® é composto por lipossomos, e já foi testado sua eficácia para a criopreservação do sêmen búfalos (ANSARI et al., 2016; NAZ et al., 2018), bovinos (ANSARI et al., 2017; LIMA-VERDE et al., 2017) e carneiros (BENMOULA et al., 2018; SOUZA et al., 2019), quando comparado ao meio extensor à base de gema de ovo.

4.2.3. Produção de espécies reativas de oxigênio no sêmen e o estresse oxidativo

A membrana lipídica dos espermatozoides possui grandes quantidades de fosfolipídeos, esteróis, ácidos graxos saturados e poli-insaturados, o que torna essas células extremamente susceptíveis ao processo de peroxidação lipídica. Todos esses componentes lipídicos estão associados com a maturação espermiática, espermatogênese, capacitação e reação acrossomal (SANOCKA & KURPISZ, 2004).

Quando se realiza o processo de criopreservação, os espermatozoides são submetidos ao choque térmico e ao ataque oxidativo (EVANS, 1988; MAXWELL & WATSON, 1996). O choque térmico desencadeia no aumento da produção das espécies reativas de oxigênio (ROS), que são substâncias formadas a partir da reação de redução das moléculas de oxigênio (NORDBERG et al., 2001), prejudicando o equilíbrio entre a concentração desses radicais livres e do sistema antioxidante presente no plasma seminal (DURU et al., 2000; AITKEN & SAWYER, 2003).

As espécies reativas de oxigênio são elementos eletronicamente instáveis e altamente reativos, produzidos principalmente pela mitocôndria das células, e que atuam como agentes oxidantes, ou seja, como receptores ou

doadores de elétrons (AGARWAL et al., 2005). Os principais radicais livres encontrados são o superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroxila (OH^-) (ANDRADE et al., 2010), além de espécies reativas de nitrogênio (DOSHI et al., 2012), que são produtos normais do metabolismo celular (VALKO et al., 2007). Sendo que nos espermatozoides, o principal radical livre produzido é o O_2^- , que origina espontaneamente H_2O_2 (AITKEN & CLARKSON, 1987; ALVAREZ et al., 1987).

Essas ROS são essenciais para as funções espermáticas, como função cinética, capacitação, função fusogênica, hiperativação, reação acrossômica, ligação do espermatozoide a zona pelúcida do oócito, e estabilização mitocondrial na peça intermediária dos espermatozoides (GONÇALVES et al., 2010). Porém, o aumento na concentração de ROS acarreta em um efeito citotóxico, que ocasiona alterações nas características funcionais das células espermáticas, como redução da motilidade espermática (SIKKA, 1996) e danos ao acrossoma (ALVAREZ & STOREY, 1984), prejudicando sua sobrevivência e habilidade de fertilização (GIL-GUZMAN et al., 2001; MAXWELL & WATSON, 1996).

Os radicais livres em grandes quantidades são responsáveis pela oxidação dos grupos metílicos presentes nos ácidos graxos poli-insaturados, encontrados em grandes quantidades na membrana plasmática dos espermatozoides de mamíferos (BUCAK et al., 2010). Desse modo, o estresse oxidativo decorrente do choque térmico proporcionará um desequilíbrio entre a produção de ROS e dos sistemas antioxidantes (AITKEN et al., 2010; GUTHRIE & WELCH, 2012), ocasionando a peroxidação lipídica – geração de radical peróxido lipídico -, que afetará a composição lipídica e proteica e o conteúdo de DNA das células espermáticas (VALKO et al., 2006).

Esse processo danifica a membrana lipídica das células espermáticas e sua fluidez, além de promover malefícios ao DNA (WRIGHT et al., 2014). Isso acarreta numa perda irreversível da motilidade espermática, de enzimas intracelulares e danos ao material genético das células espermáticas (WHITE, 1993), uma vez que os produtos desse processo são mutagênicos e genotóxicos ao DNA (LUCZAJ & SKRZYDLEWSKA, 2003), tornando-as incapazes de realizar a capacitação e a fertilização (AITKEN et al., 1993).

O estresse oxidativo ocorrerá principalmente durante a passagem dos espermatozoides pelos epidídimos, durante sua maturação e transporte pelo plasma seminal, prejudicando o processo de recuperação do DNA, que só poderá ser reparado pelo oócito, durante a fase de capacitação e reação acrossomal (GONZALEZ-MARIN et al., 2012).

Na espécie bovina, os ROS são produzidos a partir de espermatozoides imóveis (SARIÖZKAN et al., 2009), porém sua origem pode ser proveniente também da presença de leucócitos – principalmente neutrófilos e macrófagos - e espermatozoides imaturos no sêmen, acarretando em anormalidades espermáticas (OCHSENDORF, 1999; SALEH et al., 2002; GARRIDO et al., 2004).

O peróxido de hidrogênio produzido pela mitocôndria das células espermáticas pode formar também grandes quantidades do radical OH^\cdot devido a presença de cobre e ferro (KEHRER, 2000). Esse fator foi demonstrado na espécie humana, na qual observou-se concentrações superiores desses microelementos no plasma seminal de homens subfêrteis (AYDEMIR et al., 2006).

Os leucócitos são considerados as maiores fontes de ROS e, conseqüentemente, de estresse oxidativo no sêmen (AITKEN & WEST, 1990; WHITTINGTON & FORD, 1999). Já foi demonstrado que a leucócitospermia apresenta uma correlação positiva na formação da reação acrossomal e no teste hiposmótico (KALELI et al., 2000), além de ser associado aos danos ao material genético dos espermatozoides (ALVAREZ et al., 2002).

A peroxidação dos ácidos graxos poli-insaturados é relacionada com diversas condições patológicas, sendo uma delas a infertilidade. O principal produto desse processo é o malondialdeído (MDA) (SANOCKA & KURPISZ, 2004). Desse modo, desenvolveu-se um método para a detecção desse produto, conhecido como teste espectrofotômetro do ácido tiobarbitúrico (TBARS). Tal técnica baseia-se na reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico com uma molécula de malondialdeído (MDA), subproduto da peroxidação de lipídios, produzindo um complexo de coloração rósea, quantificado através da leitura em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 532nm (BUEGE & AUST, 1978).

4.2.4. Utilização de antioxidantes no meio diluidor do sêmen

Já foi detectado um sistema antioxidante natural presente no espermatozoide e no plasma seminal (STOREY, 1997), composto por antioxidantes enzimáticos como a glutathiona redutase (GSH), glutathiona peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), e os não enzimáticos como taurina, vitamina E, hipotaurina, carotenoides e piruvato (ALVAREZ & STOREY, 1982; BILODEAU et al., 2000), que ajudam na prevenção dos danos oxidativos através da inibição da produção excessiva de ROS (STOREY, 1997). Esse sistema foi detectado em várias espécies, incluindo ovinos (BUCAK & ATESSAHIN, 2008), caprinos (BUCAK et al., 2007) e bovinos (SARIÖZKAN et al., 2009).

Esse sistema possui origem citoplasmática, porém durante os estágios finais da diferenciação nos epidídimos, os espermatozoides perdem a maior parte desse citoplasma. Essa redução citoplasmática prejudica a capacidade antioxidante dessas células de neutralizar os efeitos deletérios das ROS e a peroxidação lipídica, tornando-os extremamente sensíveis aos processos de congelamento e descongelamento (STOREY, 1997). Ainda, a habilidade antioxidante das células espermáticas torna-se restrita durante o armazenamento prolongado em temperaturas acima de 0°C (GADEA et al., 2004).

Os antioxidantes enzimáticos, conhecidos também como antioxidantes naturais, neutralizam os ROS em excesso, e previnem os danos ocasionados por essas moléculas na membrana celular. Já os antioxidantes não enzimáticos ou sintéticos, que são influenciados pela dieta do indivíduo, que deve possuir vitaminas e minerais, como vitamina C, vitamina E e zinco (AGARWAL et al., 2005), podem atuar de duas maneiras: retirando o agente oxidante antes de ocasionar lesão, ou como restaurador da lesão sucedida pela presença dos radicais livres (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Na tentativa de reduzir a peroxidação lipídica e seus danos, melhorando assim, os índices de fertilidade dos sêmens refrigerados e congelados, evidenciou-se a importância do acréscimo de antioxidantes nos meios diluidores, para a proteção das células espermáticas durante a manipulação do sêmen e redução de temperatura (SILVA & GUERRA, 2011).

4.2.5. Superóxido dismutase

O superóxido dismutase (SOD) é considerado um antioxidante enzimático, ou seja, que neutraliza os efeitos oxidativos das espécies reativas de oxigênio. Sua função é remover o radical superóxido e convertê-lo em peróxido de hidrogênio (AGARWAL et al., 2005).

Essa enzima é produzida pelo organismo animal, podendo ser encontrada no plasma seminal, sendo também produzidas pelos espermatozoides (BILODEAU et al., 2000). A SOD age no sêmen catalisando a dismutação do ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio (NISHIKIMI & MACHLIN, 1975).

Quando submete o sêmen aos processos de refrigeração e congelamento, é necessário acrescentar um meio diluidor para conseguir manter a viabilidade espermática. Foi constatado que a atividade da enzima SOD é reduzida, quando acrescentado esses meios ao sêmen (KANKOFER et al., 2005). Essa redução da sua atividade pode acarretar a diminuição da fertilidade, fato comprovado em um estudo com o sêmen humano (PASQUALOTTO et al., 2006).

Em razão dessa redução das concentrações de SOD no sêmen refrigerado e congelado, estudos estão sendo realizados com o objetivo de testar diferentes concentrações dessa enzima (SILVA & GUERRA, 2011). Estudos realizados em galos (PARTYKA et al., 2013; AMINI et al., 2015) e alpacas (SANTIANI et al., 2013) demonstraram eficiência na adição desse antioxidante no diluente utilizado para refrigeração ou criopreservação do sêmen.

3.3.6. Ácido ascórbico

O ácido ascórbico ou vitamina C, é considerado uma vitamina hidrossolúvel, e ainda um antioxidante sintético muito importante no meio extracelular (ALVAREZ et al., 2006; HOSSEIN et al., 2007). Essa vitamina age impedindo a formação de hidroperóxido de lipídeos nas lipoproteínas plasmáticas, e desse modo, previne os possíveis danos oxidativos que afetam a células espermática (ANNAE & CREPPY, 2001; NORDBERG & ÁRNER, 2001).

São conhecidas as ações biológicas do ácido ascórbico no organismo, como síntese de colágeno, secreção hormonal e antioxidação. Com relação à sua ação no aparelho reprodutor, sabe-se que nas fêmeas possui uma

importante função no desenvolvimento folicular, uma vez que se deposita nas células da granulosa, da teca e no citoplasma periférico dos oócitos (LUCK et al., 1995), o que reduz possíveis degenerações dessas células (THOMAS et al., 2001).

Quanto ao aparelho reprodutor masculino, já foi associado que baixas concentrações de ácido ascórbico acarretam o baixo desempenho reprodutivo do macho (LUCK et al., 1995). Sua adição ao sêmen criopreservado humano não proporcionou alterações na morfologia espermática, mas também não melhorou a motilidade das células espermáticas após o processo de criopreservação. Ainda, foi capaz de reduzir os danos oxidativos ocasionados por esse processo (GARCEZ, 2011).

Sua utilização foi testada no sêmen de coelhos, e demonstrou eficácia na redução das concentrações de substâncias reativas do oxigênio. Além de favorecer a concentração de antioxidantes enzimáticos no sêmen, como superóxido dismutase e catalase (YOUSEF et al., 2007). Em bovinos, demonstrou-se que, tanto sua utilização sozinha quanto combinada com outro antioxidante enzimático, apresentaram efeitos positivos nas células espermáticas, após o processo de criopreservação do sêmen (HU et al., 2010; EIDAN, 2016).

4.4. Conclusão

O processo de criopreservação do sêmen ocasiona muitos danos a célula espermática, principalmente devido aos estresses térmico e oxidativo. O estresse oxidativo ocorre principalmente devido a produção de espécies reativas de oxigênio que prejudicam a fertilidade do sêmen reprodutor. Assim, a adição de antioxidantes no meio extensor para sêmen criopreservado poderá auxiliar na melhora dos parâmetros espermáticos e, conseqüentemente, de sua viabilidade.

4.5. REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 3, p. 1–21, 2005.

AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S.; UNIT, R. B.; ET AL. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species human spermatozoa. **Journal of Reproduction & Fertility**, n 81, 459-469, 1987.

AITKEN, R.J., WEST, K.M. Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leukocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. **International Journal of Andrology**, v; 13, p. 433-451, 1990.

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 & Fertility**, p. 441-450 , n. 97, 1993.

AITKEN, R. J.; SAWYER, D. The human spermatozoon - not waving but drowning. **Advances in Male Mediated Developmental Toxicity**, p. 85-86, 2003.

AITKEN, R. J.; DE IULIIS, G. N.; FINNIE, J. M.; ET AL. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. **Human Reproduction**, v. 25, p. 2415-2426, 2010.

AISEN, E.G.; ALVAREZ, H.L.; VENTURINO, A.; ET AL. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. **Theriogenology**, n. 53, p. 1053-1061, 2000.

AKHTER, S.; ANSARI, M. S.; RAKHA, B. A.; ET AL. Effect of low density lipoproteins in extender on freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*)

bull semen. **Theriogenology**, v. 76, n. 4, p. 759–764, 2011.

ALVAREZ, C.; STOREY, T.; TOUCHSTONE, C. Spontaneous Hydrogen Superoxide Enzyme Lipid Peroxide Dismutase Peroxidation and Production in Human of Spermatozoa and Superoxide as Major Against Oxygen Toxicity. **Journal of Andrology**, p. 338–348, 1978.

ALVAREZ, J. G.; SHARMA, R. K.; PH, D.; ET AL. Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin. **Fertility and Sterility**, v. 78, n. 2, p. 319–329, 2002.

ALVAREZ, C. A.; MORAES, G. V. DE. Efeitos Da Selenometionina E Vitamina C Sobre O Sêmen. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 1, n. 1, p. 45–51, 2006.

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Special review**, v. 7, n. 3, p. 145–173, 1987.

AMINI, M. R.; KOHRAM, H.; SHAHANEH, A. Z.; ET AL. The effects of different levels of catalase and superoxide dismutase in modified Beltsville extender on rooster post-thawed sperm quality. **Cryobiology**, 2015.

ANANE, R.; CREPPY, E. E. Lipid peroxidation as pathway of aluminium cytotoxicity in human skin fibroblast cultures: Prevention by superoxide dismutase plus catalase and vitamins E and C. **Human & Experimental Toxicology**, v. 20, n. 9, p. 477–481, 2001.

ANDRADE, E. R.; MELO-STERZA, F. A.; SENEDA, M. M.; ET AL. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 2, p. 79–85, 2010.

ANSARI, M. S.; RAKHA, B. A.; AKHTER, S.; ET AL. Optixcell improves the

postthaw quality and fertility of buffalo bull sperm. **Theriogenology**, v. 85, n. 3, p. 528–532, 2016.

ANSARI, M. S.; RAKHA, B. A.; AKHTER, S. Cryopreservation of bull semen in OptiXcell® and conventional extenders: Comparison of semen quality and fertility. **Animal Science Papers and Reports**, v. 35, n. 3, p. 317–328, 2017.

AYDEMIR, B.; KIZILER, A. R.; ONARAN, I.; ET AL. Impact of Cu and Fe concentrations on oxidative damage in male infertility. **Biological Trace Element Research**, v. 112, n. 3, p. 193–203, 2006.

BAILEY, J. L. Semen Cryopreservation in Domestic Animals: A Damaging and Capacitating Phenomenon. **Journal of Andrology** v. 21, n. 1, 2000.

BATHGATE, R.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G. Studies on the Effect of Supplementing Boar Semen Cryopreservation Media with different avian egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p. 68–73, 2006.

BENMOULA, A.; ALLAI, L.; BADI, A.; ET AL. Effect of extender and storage temperature on sperm motility parameters of liquid ram semen. **Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires**, v. 6, n. 2, p. 211–219, 2018.

BILODEAU, J. F.; CHATTERJEE, S.; SIRARD, M. A.; ET AL. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, n. 3, p. 282–288, 2000.

BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO, A. L.; SANTOS, A. D. F.; ET AL. Utilização De Glicerol E Etilenoglicol como crioprotetores na congelação do sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira**, v. 5, p. 27–32, 2004.

BORGES, J. C.; SILVA, M. R.; GUIMARÃES, J. D.; ET AL. Membrana plasmática

de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35(3), p. 303–314, 2011.

BUCAK, M. N.; ATESSAHIN, A. Y. A. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. **Small Ruminant Research**, v. 75(2-3), p. 128-34, 2007.

BUCAK, M. N.; SARIÖZKAN, S.; TUNCER, P. B.; ET AL. Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities in Angora goat semen following cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 81(2-3), p. 90-5, 2008.

BUCAK, M. N.; TUNCER, P. B.; SARIÖZKAN, S.; ET AL. Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: Antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. **Cryobiology**, v. 61, n. 3, p. 248–253, 2010.

CASTRO, L. S. Efeito do estresse oxidativo no espermatozoide e relação com o desenvolvimento embrionário. **Universidade de São Paulo**, 2014.

CLEVELAND, T. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Clinical Review**, v. 4295, n. 96, p. 835–850, 1996.

DOSHI, S.B.; KHULLAR, K.; SHARMA, R.K.; ET AL. Role of reactive nitrogen species in male infertility. **Reproductive Biology**, v. 10, p. 109, 2012.

DURU, N. K.; MORSHEDI, M.; PH, D.; ET AL. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human. **Fertility & Sterility**, v. 74, n. 6, 2000.

EIDAN, S. M. Effect on post-cryopreserved semen characteristics of Holstein bulls of adding combinations of vitamin C and either catalase or reduced glutathione to Tris extender. **Animal Reproduction Science**, v. 167, p. 1–7, 2016.

EL-BELTAGI, H. S.; MOHAMED, H. I. Reactive Oxygen Species , Lipid Peroxidation and Antioxidative Defense Mechanism. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 41, n. 1, p. 44–57, 2013.

EVANS, G. Current Topics in Artificial Insemination of Sheep. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 41(1), p. 103-116, 2006.

FLAHERTY, C. O.; BECONI, M., BEORLEGUI, N. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. **Andrologia** , v. 275, p. 269–275, 1997.

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

FERREIRA, F. M.; WENTZ, I.; SCHEID, I. R.; ET AL. Comportamento de monta e características seminais de suínos jovens landrace e large white. **Ciência Rural**, v. 35, n. 1, p. 131–137, 2005.

FICKEL, J.; WAGENER, A.; LUDWIG, A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. **European Journal of Wildlife Research**, v.53, p. 81-89, 2007.

FOROUZANFAR, M.; SHARAFI, M.; HOSSEINI, S. M.; ET AL. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. **Theriogenology**, v. 73, n.4, p-480-7, 2010.

FOULKES, J. A; SWEASEY, D.; GOODEY, R. G. Fertility of bull spermatozoa in egg-yolk diluents of varied lipid fatty acid composition. **Journal of Reproduction**

& Fertility, v. 60, p. 165-169, 1980.

GADEA, J.; SELLÉS, E.; MARCO, M. A.; ET AL. 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, n. 3–4, p. 690–701, 2004.

GARCEZ, M. E. S. Efeito do resveratrol e do ácido ascórbico na criopreservação de sêmen humano. **Instituto De Biotecnologia Programa De Pós-Graduação Em Biotecnologia**, 2011.

GARRIDO, N.; MESEGUER, M.; SIMON, C.; ET AL. Proxidative and antioxidative imbalance in human semen and its relation with male infertility. **Asian Journal of Andrology**, v. 6, p. 59-65, 2004.

GLAZAR, A. I.; MULLEN, S. F.; LIU, J.; ET AL. Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol. **Cryobiology**, v. 59, n. 2, p. 201–206, 2009.

GONÇALVES, F. S.; BARRETO, F. S. S.; ARRUDA, R. P.; ET AL. Effect of antioxidants during bovine in vitro fertilization procedures on spermatozoa and embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45 (1), p. 129-35, 2010.

GONZÁLEZ-MARÍN, C.; GOSÁLVEZ, J.; ROY, R. Types , Causes , Detection and Repair of DNA Fragmentation in Animal and Human Sperm Cells. **Intenational Journal of Molecular Sciences** , p. 14026–14052, 2012.

GRAHAM, J. K.; FOOTE, R. H. Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. **Cryobiology**, v. 24, n. 1, p. 42–52, 1987.

GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R. Effects of reactive oxygen species on sperm function. **Theriogenology**, v. 78, p-1700-8, 2012.

HIDALGO, M.; DORADO, J.; RODRI, I. Cryopreservation of goat spermatozoa : Comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. **Theriogenology**, v. 68, p. 168–177, 2007.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science** , p. 3–22, 2000.

HOSSEIN, M. S.; HASHEM, M. A.; JEONG, Y. W.; ET AL. Temporal effects of α -tocopherol and l-ascorbic acid on in vitro fertilized porcine embryo development. **Animal Reproduction Science**, v. 100, n. 1–2, p. 107–117, 2007.

HU, J.; TIAN, W.; ZHAO, X.; ET AL. The cryoprotective effects of ascorbic acid supplementation on bovine semen quality. **Animal Reproduction Science**, v. 121, n. 1–2, p. 72–77, 2010.

KALELI, S.; ÖÇER, F.; IREZ, T.; ET AL. Does leukocytospermia associate with poor semen parameters and sperm functions in male infertility? The role of different seminal leukocyte concentrations. **European Jorunal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 89, p. 185–191, 2000.

KANKOFER, M.; KOLM, G.; AURICH, J.; ET AL. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5°C. **Theriogenology**, v. 63, n. 5, p. 1354–1365, 2005.

KEHRER, J. P. The Haber – Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology** , v. 149, p. 43–50, 2000.

KUNDU, C. N.; CHAKRABORTY, J.; DUTTA, P.; ET AL. Effects of dextrans on cryopreservation of goat cauda epididymal spermatozoa using a chemically defined medium. **Reproduction**, v. 123, p. 907–913, 2002.

LICI, B. U. A.; ZKARA, H. A. O. Impact of Cu and Fe Concentrations on Oxidative Damage in Male Infertility. **Biological Trace Element Research** , v. 112, p. 193–203, 2006.

LIMA-VERDE, I. B.; JOHANNISSON, A.; NTALLARIS, T.; ET AL. Effect of freezing bull semen in two non-egg yolk extenders on post-thaw sperm quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, n. 1, p. 127–136, 2018.

LIPAR, J. L.; KETTERSON, E. D.; NOLAN, V.; ET AL. Egg yolk layers vary in the concentration of steroid hormones in two avian species. **General and Comparative Endocrinology**, v. 115, n. 2, p. 220–227, 1999.

LUCK, M. R.; JEYASEELAN, I.; SCHOLLES, R. A. Ascorbic acid and fertility. **Biology of reproduction**, v. 52, n. 2, p. 262–266, 1995.

MACHLIN, J. Oxidation of α -Tocopherol model compound by Superoxide. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 689, n. 10, p. 684–689, 2000.

MAXWELL, W.M.C., WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 55-65, 1996.

MEDEIROS, A. S. L. Utilização de diferentes tipos de amidas como agentes crioprotetores para espermatozoides de garanhões. **Universidade Estadual Paulista**, 2003.

MICHAEL, A.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E.; et al. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 68, n. 2, p. 204–212, 2007.

MUINO, R.; FERNÁNDEZ, M.; PEÑA, A. I. Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with an egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after an equilibration period of 18 h. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 3, p. 305-11, 2007.

NAIR, S. J.; BRAR, A. S.; AHUJA, C. S.; ET AL. A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. **Animal Reproduction Science**, v. 96, n. 1–2, p. 21–29, 2006.

NAZ, S.; UMAIR, M.; IQBAL, S. Comparison of Tris egg yolk-based, Triladyl® and Optixell® extender on post-thaw quality, Kinematics and in vivo fertility of Nili Ravi Buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. **Andrologia**, v. 50, n. 8, p. 1–6, 2018.

NISHIKIMI, M.; MACHLIN, L. J. Oxidation of α -tocopherol model compound by superoxide anion. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.170, p. 684-689, 1975.

NKOMA, B.; SHERBROOKE, D. Spermiogenesis and DNA Repair : A Possible Etiology of Human Infertility and Genetic Disorders. **Systems Biology in Reproductive Medicine** , p. 3–10, 2008.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system¹ ¹This review is based on the licentiate thesis “Thioredoxin reductase—interactions with the redox active compounds 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and lipoic acid” by Jonas Nordberg,. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287–1312, 2001.

OCHSENDORF, F. R. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. **Human Reproduction Update**, v. 5, n. 5, p. 399–420, 1999.

OLLERO, M.; LOPEZ, M. C.; SHARMA, R. K.; ET AL. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. **Human Reproduction**, v. 16, n. 9, p. 1922–1930, 2001.

O’FLAHERTY, C.; BECONI, M.; BEORLEGUI, N. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. **Andrologia**, v. 29, n. 5, p. 269–275, 1997.

PACE., M.M.; GRAHAM, E. F. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. **Journal of Animal Science**, v. 39, n. 6, 1974.

PARTYKA, A.; NIZAŃSKI, W.; BAJZERT, J.; ET AL. The effect of cysteine and superoxide dismutase on the quality of post-thawed chicken sperm. **Cryobiology**, v. 67, n. 2, p. 132–136, 2013.

PASQUALOTTO, F. F.; PASQUALOTTO, E. B.; UMEZU, F. DE M.; ET AL. Atividades da superóxido-dismutase e catalase no sêmen de homens férteis e inférteis. **Revista da AMRIGS**, v. 50, n. 5, p. 130–134, 2006.

PUGLIESI, G.; DE CARVALHO, G. R.; RATES, D. M.; ET AL. Viability and fertility of cooled equine semen diluted with skimmed milk or glycine egg yol-based extenders. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41. n. 12, p. 2411-2417, 2012.

PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 63, n. 3, p. 215–225, 2006.

QUINN, P. J.; CHOW, P. Y. W.; WHITE, I. G. From Cold Shock At a Plasma Membrane Site. **Cryobiology**, 2006.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 77-111, 2006.

SALEH, R. A.; AGARWAL, A.; PH, D.; ET AL. Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. **Fertility and Sterility** , v. 78, n. 6, 2002.

SANOCKA, D.; KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, n. Table 2, p. 12, 2004.

SARIÖZKAN, S.; NUMAN, M.; BARBAROS, P.; ET AL. The influence of cysteine and taurine on microscopic – oxidative stress parameters and fertilizing ability of

bull semen following cryopreservation. **Cryobiology**, v. 58, p. 134–138, 2009.

SANTIANI, A.; EVANGELISTA, S.; VALDIVIA, M.; ET AL. Theriogenology Effect of the addition of two superoxide dismutase analogues (Tempo and Tempol) to alpaca semen extender for cryopreservation. **Theriogenology**, v. 79, n. 5, p. 842–846, 2013.

SELLE, E.; MARCO, M. A.; COY, P.; ET AL. 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.

SEIDMAN, M. D.; KHAN, M. J.; TANG, W. X.; ET AL. Influence of lecithin on mitochondrial DNA and age-related hearing loss. **Otolaryngology-head and neck Surgery**, v. 127, n. 3, p. 138-144, 2002.

SIKKA, C.; ORLEANS, N. Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Male Infertility Minireview. **Journal of Andrology**, v. 16, n. 6, p. 464–468, 1995.

SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, p. 370–384, 2011.

SNOECK, P. P. N.; HENRY, M.; MELO, M. I. V. Efeito de diferentes diluidores sobre a viabilidade espermática pós-descongelção de sêmen eqüino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 59, n. 1, p. 56–64, 2007.

SOUZA, C. V. DE; BRANDÃO, F. Z.; SANTOS, J. D. R.; ET AL. Effect of different concentrations of L-carnitine in extender for semen cryopreservation in sheep. **Cryobiology**, v. 89, p. 104–108, 2019.

STOREY, B. T. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa*. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, n. 3, p. 203–213, 1997.

STOREY, T. Assessment of Cell Damage Peroxidation Caused by Spontaneous Spermatozoa Lipid in Rabbit of Obstetrics. **Biology of Reproduction** , p. 323–331, 1984.

STRADAIOLI, G.; NORO, T.; SYLLA, L.; ET AL. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: Comparison between two extenders. **Theriogenology**, v. 67, n. 7, p. 1249–1255, 2007.

THOMAS, F. H.; LEASK, R.; SRŠEN, V.; ET AL. Effect of ascorbic acid on health and morphology of bovine preantral follicles during long-term culture. **Reproduction**, v. 122, n. 3, p. 487–495, 2001.

THUN, R.; HURTADO, M.; JANETT, F. Comparison of Biociphos-Plus 1 and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. **Theriogenology**, v. 57, p. 1087–1094, 2002.

UCZAJ, W. Ł.; SKRZYDLEWSKA, E. L. Ż. B. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 8, p. 391 – 413, 2003.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; ET AL. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The Internatopmal Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44–84, 2007.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; ET AL. Free radicals , metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1–40, 2006.

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(4), p. 871-891, 995.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 481–492, 2000.

WHITE, I. G. Lipids and Calcium Uptake of Sperm in Relation to Cold Shock and

Preservation : a Review. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 5, p. 639-58, 1993.

WHITTINGTON, K.; FORD, W. C. L. Relative contribution of leukocytes and of spermatozoa to reactive oxygen species production in human sperm suspensions. **International Journal of Andrology** , v. 235, p. 229–235, 1999.

WRIGHT, C.; WRIGHT, C. Sperm DNA damage caused by oxidative stress : modifiable clinical , lifestyle and nutritional factors in male infertility. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 28, p. 684-703, 2014.

YOUSEF, M. I.; AWAD, T. I.; ELHAG, F. A.; ET AL. Study of the protective effect of ascorbic acid against the toxicity of stannous chloride on oxidative damage, antioxidant enzymes and biochemical parameters in rabbits. **Toxicology**, v. 235, n. 3, p. 194–202, 2007.

5. CAPÍTULO II

ADIÇÃO DA SUPERÓXIDO DISMUTASE E DO ÁCIDO ASCÓRBICO AO DILUENTE OPTIXCELL® NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN BOVINO

Addition of superoxide dismutase and ascorbic acid to the Optixcell® diluent in
the cryopreservation of bull semen

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo testar dois antioxidantes importantes para o controle da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), a superóxido dismutase (SOD) e o ácido ascórbico (AC). Foram realizadas cinco coletas de cinco reprodutores bovinos, com intervalo de dois dias entre elas. Em cada coleta formou-se um *pool* com o sêmen dos cinco animais utilizados. O *pool* formado em cada coleta foi dividido em 5 grupos, sendo eles: grupo controle (GC), grupo ácido ascórbico I (GACI), grupo ácido ascórbico II (GACII), grupo superóxido dismutase I (GSODI) e grupo superóxido dismutase II (GSODII). No GC, o sêmen era diluído no meio extensor Optixcell®, sem adição desses antioxidantes. Para os grupos testes, acrescentou-se no meio extensor doses diferentes dos dois antioxidantes: GACI apresentava a dose de 4,5 mg/mL e o GAC II a dose de 6,5 mg/mL de ácido ascórbico, o GSOD I apresentava a dose de 250 U/mL e o GSOD II a dose de 500 U/mL de superóxido dismutase. Após a diluição, as amostras foram refrigeradas a 5°C, em câmara resfriadora, por 4 horas, para posterior envase em palhetas de 0,25 mL (dose inseminante de 30 x 10⁶), e congelamento em vapor de nitrogênio líquido, por 20 minutos. Após esse processo, as amostras foram armazenadas em botijão criogênico a -196°C. Após isso, duas palhetas de cada grupo foram colocadas em banho maria a 37°C por 15 segundos, para posterior avaliação no sistema CASA quanto á motilidade total e progressiva (MT e MP), velocidade média (VAP), velocidade retilínea (VSL), velocidade total (VCL), amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN). Avaliou-se também e integridade de membrana (teste hiposmótico - HOST) e a morfologia espermática (ME) de cada amostra, pela solução formol-salina. Ainda, foram realizadas análises bioquímicas: potencial antioxidante (FRAP), teste do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e medição das ROS. Após avaliação, constatou-se que a MT foi reduzida nos grupos AC I e SOD I. Do mesmo modo, o GSOD II proporcionou redução significativa da MP. Já os parâmetros de VCL e ALH, o GSODI foi o que demonstrou melhores resultados, e a adição de ácido ascórbico reduziu esses valores, quando comparado ao GC. Com relação a LIN e STR o GAC II demonstrou melhorar esses parâmetros e, em contrapartida, o GSOD I reduziu a LIN e STR, em relação ao GC. Porém, o GAC II demonstrou aumento na peroxidação lipídica da membrana espermática, e o GSOD I foi capaz de reduzir o estresse oxidativo. Ainda, o ácido ascórbico em ambas doses (GAC I e GAC II) demonstrou melhor potencial antioxidante, quando comparado aos outros grupos.

Palavras-chave: touro, criopreservação, sêmen, antioxidantes

ABSTRACT

The present study aimed to test two important antioxidants for controlling ROS generation, superoxide dismutase and ascorbic acid. Five collections were made from five bulls, every two days. In each collection, the five bull's semen was pooled. This pool was divided into five groups, which are: control group (CG), ascorbic acid group I (ACG I), ascorbic acid group II (ACG II), superoxide dismutase group I (SODG I) and superoxide dismutase group II (SODG II). In the CG, the semen was diluted in the Optixcell® extender, without any addition of these antioxidants. For the test groups, different doses of the two antioxidants were added to the extender: ACG I had a dose of 4.5 mg/mL and ACG II had a dose of 6.5 mg/mL of ascorbic acid, SODG I had a dose of 250 U/mL and SODG II a dose of 500 U/mL of superoxide dismutase. After dilution, the samples were refrigerated at 5°C, in a cooling chamber, for 4 hours, for subsequent filling in 0,25 mL straws (inseminating dose of 30×10^6), and freezing in liquid nitrogen steam, for 20 minutes. After this process, the samples were stored in a cryogenic cylinder at -196°C. After that, two straws from each group were placed in a water bath at 37°C for 30 seconds, for later evaluation in the CASA system, regarding motility (TM and PM), average speed (VAP), straight line (VSL), total speed (VCL), amplitude of lateral displacement (ALH), straightness (STR) and linearity (LIN). Membrane integrity (hyposmotic test – HOST) and sperm morphology (SM) of each sample were also evaluated. In addition, biochemical analyzes were performed: antioxidant potential (FRAP), thiobarbituric acid test (TBARS) and ROS measurement. After evaluation, it was found that TM were reduced in ACG I and SODG I groups. Likewise, SODG II resulted in significant reduction in PM. Already for the parameters of VCL and ALH, SODG I was the one that showed better results, and the addition of ascorbic acid reduced these values, when compared to the CG. In relation to LIN and STR, ACG II demonstrated to improve these parameters and, in contrast, SODG I reduced LIN and STR, in relation to CG. However, ACG II group increased the lipid peroxidation of the sperm membrane, and SODG I group was able to reduce oxidative stress. Also, ascorbic acid (ACG I and ACG II) demonstrated better antioxidant potential, when compared to other groups.

Key-words: bull, cryopreservation, semen, antioxidants

5.1. INTRODUÇÃO

A inseminação artificial é uma biotecnologia da reprodução, que possui vantagens quando comparada à utilização da monta natural (BORGES et al., 2011). Juntamente com seu desenvolvimento, foi necessário o aperfeiçoamento da qualidade do sêmen criopreservado. Entretanto, esse processo submete os espermatozoides a condições adversas (PUDRY, 2006), acarretando na produção excessiva e contínua de ROS, que proporciona redução drástica das substâncias antioxidantes presentes no plasma seminal, o que prejudica a viabilidade das células espermáticas (AGARWAL et al., 2003).

Esse estresse celular envolve principalmente os efeitos do choque térmico e do estresse oxidativo. Esse, por sua vez, é uma consequência relacionada com o aumento de danos celulares induzidos pelo oxigênio, e oxidantes derivados do oxigênio, conhecidos como ROS (SIKKA et al., 1995). Os ROS são formados durante reações enzimáticas normais, porém quando ocorre excesso de sua produção tornam-se prejudiciais aos espermatozoides e a fertilidade do sêmen (SHARMA & AGARWAL, 1996).

Para tanto, é necessário a adição de antioxidantes aos meios extensores para fornecer maior proteção as células espermáticas contra o estresse oxidativo (BANSAL & BILASPURI, 2010). Antioxidantes enzimáticos como a catalase e a glutathione estão sendo estudados para verificação de sua eficácia para manter a viabilidade espermática, juntamente com antioxidantes sintéticos, como a vitamina E e a melatonina.

AMINI et al. (2015) demonstraram que a catalase, quando adicionada ao diluente para criopreservação do sêmen de galos, melhorou os parâmetros espermáticos e reduziu a peroxidação lipídica ocasionada por esse processo. Da mesma maneira, a adição da vitamina E ao diluente atestou efeito protetor na manutenção da integridade de membrana e não prejudicou os parâmetros espermáticos, no sêmen criopreservado de cães (MICHAEL et al., 2007).

Desse modo, objetivou-se com esse trabalho testar dois antioxidantes, um enzimático (superóxido dismutase - SOD) e outro natural (ácido ascórbico), para avaliar se a adição dos mesmos no meio diluidor para a criopreservação de sêmen bovino, melhorariam a qualidade do ejaculado e sua viabilidade.

5.2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais do setor de ciências agrárias da Universidade Federal do Paraná (protocolo 086/2019). Foram utilizados 5 bovinos adultos, da raça Alberdeen Angus, com idade de 2 a 5 anos, alojados na Central de Processamento e Congelamento de sêmen bovino Renascer Biotecnologia, situada à latitude $-29^{\circ} 45' 17''$ S e longitude $-57^{\circ} 05' 18''$ W. Os animais permaneciam em sistema extensivos, em piquetes, com acesso á pastagem de campo nativo. Recebiam suplementação alimentar com ração e feno. O fornecimento de água e minerais foi *ad libitum*.

Foram colhidos 5 ejaculados de cada reprodutor, a cada dois dias, pelo método de vagina artificial. Após cada coleta, era formado um *pool* de sêmen (5 mL), com o ejaculado dos cinco reprodutores coletados no dia, totalizando cinco *pools* de sêmen. Para o processo de criopreservação, utilizou-se o meio diluidor comercial Optixcell® (IMV, França) para diluição do sêmen e posterior congelamento.

Cinco grupos foram formados, com adição de ácido ascórbico e superóxido dismutase (SIGMA-ALDRICH, Alemanha). Desse modo, o sêmen fresco foi dividido em cinco frações iguais, que foram diluídas ao meio extensor para obter-se a dose inseminante de 30×10^6 de espermatozoides/mL. A primeira fração foi diluída com o meio diluidor Optixcell® (sem adição de antioxidantes), considerado o grupo controle (GC). As outras frações foram utilizadas para formação dos grupos tratamento, que apresentavam doses diferentes dos antioxidantes utilizados: o GAC I acrescentou-se 4,5 mg/mL de ácido ascórbico (HU et al., 2010), o GAC II acrescentou-se 6,5 mg/mL de ácido ascórbico (HU et al., 2010), o GSOD I acrescentou-se 250 U/mL da enzima superóxido dismutase (FOOTE et al., 2002) e o GSOD II acrescentou-se 500 U/mL da enzima superóxido dismutase (FOOTE et al., 2002), como pode ser observado no fluxograma (figura 1).

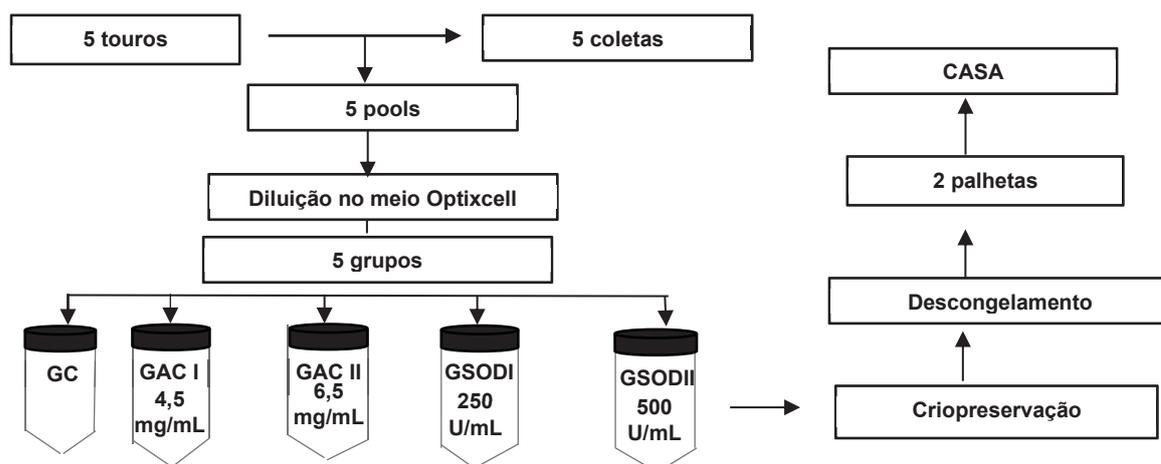


FIGURA 1. DIAGRAMA DO ESTUDO EXECUTADO COM SÊMEN DE TOUROS DA RAÇA ALBERDEEN ANGUS.

5.2.1. Coleta do sêmen

Os animais selecionados, pertencentes à Central de Reprodução eram condicionados e coletados rotineiramente, duas vezes na semana. O método de coleta utilizado foi vagina artificial, preparada com água pré-aquecida a 45°C dentro do tubo flexível, e com tubo de 20 mL descartável acoplado em uma das extremidades.

5.2.2. Processamento do sêmen

Imediatamente após a obtenção da amostra, foi realizada uma análise microscópica para avaliar a qualidade do ejaculado obtido, quanto à presença de turbilhonamento, motilidade progressiva maior ou igual a 70% e vigor. Ejaculados sem essas características não foram utilizados no experimento.

Em cada coleta, utilizava-se 1 mL de sêmen de cada touro, para a formação do *pool*, totalizando 5 mL. Após a formação desse *pool*, foi feita uma nova avaliação microscópica do ejaculado.

Ao realizar a diluição do sêmen com o diluente comercial Optixcell®, na proporção de 1:2, o *pool* foi fracionado em cinco grupos para posterior criopreservação. A primeira fração de cada *pool* era destinada a preparação do GC, que foi composto pelo sêmen fresco diluído ao diluente Optixcell®, sem adição de antioxidantes. Nos grupos tratamentos, foram adicionados ao meio

extensor utilizado 4,5 mg/mL (GACI) e 6,5 mg/mL (GACII) de ácido ascórbico, e 250 U/mL (GSODI) e 500 U/mL (GSODII) de superóxido dismutase.

Após as diluições nos seus respectivos meios, procedeu-se o resfriamento das amostras em câmara resfriadora à 5°C durante 4 horas. Após esse período, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,25 mL e acondicionadas sobre um suporte, para serem dispostas na máquina de vapor de nitrogênio líquido por 20 minutos. Decorrido esse tempo, as palhetas foram estocadas em botijão criogênico, a - 196°C. A fim de evitar o possível efeito de palhetas, foi realizado o descongelamento das amostras em duplicidade, em banho-maria, com água aquecida à 37°C por 15 segundos. Após esse processo, o conteúdo de cada palheta foi transferido para microtubos de 2,0 mL, mantidos em placa aquecedora à 37°C.

5.2.3. Sistema computadorizado de análise espermática (Casa – Computer Assisted Sperm Analysis; IMV, França)

Os parâmetros de cinética espermática foram analisados pelo Sistema Computadorizado de Análise Espermática (CASA – Computer Assisted Sperm Analysis; Hamilton Thorne Ivos II) logo após o período de 15 segundos para o descongelamento das amostras. Foram descongeladas duas palhetas por grupo, após cada coleta, realizando-se uma diluição de 1:2 no meio Optixcell®, em microtubo tipo *ependorff* de dois mL para posterior análise.

Foram pipetadas dois microlitros dessa diluição em lâminas Lejas com 8 cavidades (IMV, França), para que cada grupo fosse analisado no sistema computadorizado.

Em todos os grupos, foram analisados os parâmetros de motilidade espermática total (MT, %), motilidade espermática progressiva (MP, %), velocidade média de percurso (VAP), velocidade retilínea (VSL, μ /s), velocidade total (VCL, μ /s), amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH, μ m), retilinearidade (STR = VSL/VCL, %) e linearidade (LIN = VSL/VCL, %).

5.2.4. Avaliação da integridade da membrana plasmática (Teste Hiposmótico)

Nesse teste avalia-se a funcionabilidade da membrana espermática, baseando-se nas propriedades de manutenção do equilíbrio osmótico entre o

ambiente intra e extracelular. O espermatozoide com membrana espermática íntegra apresenta influxo de água quando submetido a um ambiente de baixa osmolaridade, resultando em dobramento ou enrolamento de sua cauda. O teste foi realizado diluindo-se 10 microlitros de sêmen com 100 microlitros de água, em banho-maria a 37°C, por 30 minutos. Em seguida, avaliou-se em microscópio com objetiva de 40x, diferentes campos óticos, até atingir a contagem de 200 espermatozoides (CBRA, 2013).

5.2.5. Avaliação da morfologia espermática

A avaliação morfológica dos espermatozoides foi realizada pelo método de câmara úmida, na qual 20 microlitros de sêmen foram diluídos em 1 mL de solução de formaldeído-salina (diluição de 1:500). Subsequentemente, 10 microlitros de cada amostra foram colocados sobre lâmina e cobertos com lamínula, e avaliação foi realizada em microscopia de contraste de fase, objetiva 1000x, contando-se 100 espermatozoides (CBRA, 2013).

5.2.6. Mensuração da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica (LPO) foi mensurada através do teste ácido tiobarbitúrico (TBARS), com base na metodologia proposta por OHKAWA, OHISH & YAGI (1979). Tal método desenvolve a reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico com uma molécula de malondialdeído (MDA), subproduto da peroxidação lipídica. A concentração das espécies reativas ao TBARS é mensurada através da espectrofotometria, que verifica a susceptibilidade das células espermáticas ao estresse oxidativo.

Realizou-se uma diluição de 1:1, da amostra de sêmen de cada grupo com o TCA 20% (250 µL de TCA20% e 250 µL de sêmen). Essas diluições foram homogeneizadas e centrifugadas por 15 minutos, a 336 G. Após a centrifugação das amostras, retirou-se 200 µL do sobrenadante para ser adicionado a 200 µL de TBA 0,8% (ácido tiobarbitúrico), mantendo-os em banho maria a 95°C por 10 minutos.

A concentração do TBARS foi determinada através da comparação da absorbância das amostras a 532 nm com uma curva padrão criada utilizando o malondialdeído (MDA). Os resultados foram expressos em nmol de MDA/mL.

5.2.7. Mensuração dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS)

As espécies reativas de oxigênio foram determinadas por um método espectrofluorimétrico, utilizando 2', 7'-diclorofluoresceína diacetato (DCF-D) (LOETCHUTINAT et al., 2005). Separou-se 10 µl da amostra de sêmen de cada grupo, de cada ejaculação. As amostras foram incubadas no escuro com 5 µL de DCF-C (1mM). A oxidação da DCF-D para diclorofluoresceína (DCF) fluorescente foi monitorada pelas espécies reativas. A absorbância foi mensurada por espectrofotômetro a 380 nm, nos tempos 0', 60' e 120', após a adição da DCF-D, em espectrofluorímetro Shimadzu (modelo RF-5301PC). Os resultados foram expressos em unidade de fluorescência (UF).

5.2.8. Potencial antioxidante redutor férrico (FRAP)

O teste FRAP foi realizado baseado no método de BENZIE & STRAIN (1996). Os antioxidantes presentes nas amostras foram avaliados como redutores do Fe⁺³ a Fe⁺², que é quelado pela 2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) para formar o complexo Fe⁺²-TPTZ, com absorção máxima em 592 nm. O ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo com absorção máxima em 592 nm, e os resultados são expressos em µg equivalente de ácido ascórbico.

5.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente, as variâncias das amostras desses tratamentos foram avaliadas quanto a homogeneidade pelo teste de Bartlett (1937) ao nível de 5% de significância. Quando pelo menos uma variável apresentou tratamentos com variâncias heterogêneas, realizou-se transformação dos valores pela raiz quadrada, para reduzir a variância entre as amostras e testar o efeito dos tratamentos pelo teste de Fisher, análise de variâncias (ANOVA).

Havendo diferenças com significância estatística de 95% de probabilidade de confiança em pelo menos uma das médias, utilizou-se o teste de Tukey ao nível de 95% de probabilidade de confiança para compará-las e agrupá-las e, também, aplicou-se o teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos resíduos da ANOVA.

As variáveis motilidade progressiva (MP), velocidade total (VAP), e velocidade curvilínea (VCL) e integridade de membrana (HOST) não apresentaram resíduos da ANOVA com distribuição normal. Assim, aplicou-se o

teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis para verificar a existência de diferença estatística entre as médias dos tratamentos. Todas as análises foram realizadas com funções presentes no *software* R 3.6.1 (R CORE TEAM, 2019).

5.4. RESULTADOS

A adição de antioxidantes ao diluente no sêmen bovino criopreservado afetou seus parâmetros espermáticos, quando comparado ao GC. Isso pôde ser observado principalmente nos parâmetros de motilidade total e progressiva (MT e MP), amplitude de deslocamento lateral (ALH), retilinearidade (STR), linearidade (LIN) e velocidade total (VCL). Com relação aos parâmetros bioquímicos somente potencial antioxidante redutor férrico (FRAP) apresentou diferenças entre os grupos testados.

Com relação a MT, a adição do antioxidante ácido ascórbico e da superóxido dismutase ao diluente Optixcell®, na dose de 4,5 mg/mL (GAC I) e 500 U/mL (GSOD II), ocasionou queda nos valores desse parâmetro (42,0% e 40,8%, respectivamente), quando comparado ao GC (54,6%). Já a adição do antioxidante enzimático ao diluente (SOD) na dose de 250 U/mL (GSOD I), e do ácido ascórbico na dose de 6,5 mg/mL (GAC II), não foi observado diferença estatística na MT (48,4% e 47,2%, respectivamente), em comparação ao GC (tabela 1).

Quanto a MP, somente o grupo SOD II também acarretou na redução desse parâmetro (26,2%), quando comparado ao GC (34,8%) e GAC II (34,0%), apresentando diferenças significativas com esses dois grupos (tabela 2).

TABELA 1. MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA MOTILIDADE TOTAL (MT), AMPLITUDE DE DESLOCAMENTO DE CABEÇA (ALH), VELOCIDADE TOTAL (VCL), RETILINEARIDADE (STR), LINEARIDADE (LIN) e VELOCIDADE RETILÍNEA (VSL) NOS GRUPOS CONTROLE (GC), GRUPO ÁCIDO ASCÓRBICO I (GAC I), GRUPO ÁCIDO ASCÓRBICO II (GAC II), GRUPO SUPERÓXIDO DISMUTASE I (GSOD I) E GRUPO SUPERÓXIDO DISMUTASE II (GSOD II) NO SÊMEN DE TOUROS DA RAÇA ALBERDEEN ANGUS.

Variável	MT (%)	ALH (µm)	VCL (µm/s)	STR (%)	LIN (%)	VSL (µ/s)
GC	54.6±8.2a	7.24±0.7ab	170.1±15.9ab	76.8±4.3ab	43.8±4.7ab	69.8±3.4a

GAC I	42.0±3.7b	6.62±0.5b	149.84±10.9c	81.4±2.7ab	48.4±3.2ab	69.8±4.5a
GAC II	47.2±5.8ab	6.52±0.7b	147.34±9.3c	82.8±3.2a	50.2±3.3a	71.6±4.3a
GSOD I	48.4±4.5ab	8.24±0.7a	174.36±8.9a	75.2±1.6b	40.4±2,1b	67.0±4.0a
GSOD II	40.8±2.8b	7.54±1.1ab	155.42±7.0bc	77.4±5.6ab	43.8±6.8ab	65.5±7.0a
p-valor entre grupos	0.2979	0.6477	0.5821	0.2357	0.2300	0.6729

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si ($p>0,05$).

Para o parâmetro de ALH analisado, a adição do antioxidante não enzimático ao meio, nas doses de 4,5 mg/mL (GAC I) e 6,5 mg/MI (GAC II) acarretou na redução da amplitude do deslocamento lateral de cabeça dos espermatozoides (6,62 μ m e 6,52 μ m, respectivamente), quando comparado ao GC (7,24 μ m) . Porém, essa redução não apresentou diferença significativa somente com o GC (tabela 1).

A adição do antioxidante enzimático na dose de 250 U/mL proporcionou melhores valores de ALH (8,24 μ m), em relação ao GC e aos outros grupos tratamentos. Porém, só apresentou diferença significativa com os grupos GAC I e GAC II (tabela 1). Já relatou-se que maiores valores de ALH estão associados a uma menor qualidade espermática, prejudicando o movimento progressivo dessas células (ARRUDA, 2000).

A enzima SOD, na dose de 250 U/mL (GSOD I) demonstrou queda nos valores de retilinearidade (STR) (75,2%), comparando aos GC (76,8%), GAC I (81,4%), GAC II (82,8%) e SOD II (77,4%). Porém, apresentou somente diferença estatística com o GAC II (tabela 1).

Da mesma maneira que ocorreu com a STR, quando se analisou a linearidade (LIN), o GSOD I apresentou resultados inferiores (40,4%), em relação aos GC (43,8%), GAC I (48,4%), GAC II (50,2%) e GSOD II (43,8%), apresentando diferença estatística somente com o GAC II (tabela 1). Relatou-se que melhores valores de STR e LIN pode influenciar na movimentação retilínea dos espermatozoides, favorecendo a capacidade de fertilização (GALLEGO, 2010).

Quando se acrescentou o ácido ascórbico ao diluente, em ambas as doses (GAC I e GAC II), foi observado queda significativa na velocidade total dos espermatozoides (VCL) (149,8 μ m/s e 147,3 μ m/s, respectivamente), diferente

dos GC (170,1 $\mu\text{m/s}$), GSOD I (174,3 $\mu\text{m/s}$) e GSOD II (155,4 $\mu\text{m/s}$) (tabela 1). Esses resultados demonstram que os espermatozoides contidos nas amostras não estão hiperativados. A hiperativação seria indicada pelo aumento da ALH e da VCL, e redução da LIN (JANUSKAUSKAS et al., 1999), que reflete diretamente na qualidade dos movimentos flagelares dessas células (SOUZA, 2007).

TABELA 2. MEDIANA E IQR DA MOTILIDADE PROGRESSIVA (MP), MORFOLOGIA ESPERMÁTICA (ME), INTEGRIDADE DE MEMBRANA (HOST) E VELOCIDADE MÉDIA DE PERCURSO (VAP) NOS GRUPO CONTROLE (GC), GRUPO ÁCIDO ASCÓRBICO I (GAC I), GRUPO ÁCIDO ASCÓRBICO II (GAC II), GRUPO SUPERÓXIDO DISMUTASE I (GSOD I) E GRUPO SUPERÓXIDO DISMUTASE II (GSOD II) NO SÊMEN DE TOUROS DA RAÇA ALBERDEEN ANGUS.

Variável	MP (%)	ME (%)	HOST (%)	VAP
GC	34.8 \pm 0.12a	51.0 \pm 0.3a	41.0 \pm 0.28a	94.0 \pm 0.7a
GAC I	29.2 \pm 0,2ab	45.0 \pm 0.8a	38.0 \pm 0.26a	86.8 \pm 0.6a
GAC II	34.0 \pm 0,9a	44.0 \pm 0.5a	28.0 \pm 0.33a	84.4 \pm 0.5a
GSOD I	29.8 \pm 0.7ab	40.0 \pm 0.20a	24.0 \pm 0.33a	92.0 \pm 0.8a
GSOD II	26.2 \pm 0.8b	46.0 \pm 0.26a	27.0 \pm 0.20a	83.6 \pm 0.5a
p-valor entre grupos	0.0832	0.2262	0.7015	0.7914

Médias seguidas da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si ($p>0,05$).

As variáveis VSL, VAP, morfologia espermática (ME) e integridade de membrana espermática (teste hiposmótico) não apresentaram diferenças estatísticas entre nenhum dos grupos analisados (tabela 1 e 2).

Dentre as análises bioquímicas realizadas, o potencial antioxidante redutor férrico (FRAP) foi o que demonstrou maiores variações nos seus resultados. A adição de ácido ascórbico nas doses de 4,5 mg/mL (GAC I) e 6,5 mg/mL (GAC II) acarretaram no aumento da atividade antioxidante (8315,4 e 9482,8 μg equivalentes de ácido ascórbico, respectivamente), em contraposto aos GC, GSOD I e GSOD II (tabela 3).

O antioxidante enzimático na dose de 500 U/mL (GSOD II) proporcionou uma redução da atividade antioxidante presente no meio (374,9 µg equivalentes de ácido ascórbico), apresentando uma diferença significativa em relação ao GC (600,5 µg equivalentes de ácido ascórbico).

TABELA 3. MÉDIA E DESVIO PADRÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE (FRAP) E DO NÍVEL DE MDA (TBARS) NOS GRUPOS CONTROLE (GC), GRUPO ÁCIDO ASCÓRBICO I (GAC I), GRUPO ÁCIDO ASCÓRBICO II (GAC II), GRUPO SUPERÓXIDO DISMUTASE I (GSOD I) E GRUPO SUPERÓXIDO DISMUTASE II (GSOD II).

Variável	FRAP (µg de AC)	MDA (nmol/mL)	ROS (UF)
GC	600.5±159.8c	2.67±0.2a	11.6±3.7a
GAC I	8315.4±555.5b	2.75±0.1a	12.2±4.6a
GAC II	9482.9±236.9a	3.08±0.2a	12.2±1.4a
GSOD I	430.1±88.6cd	2.65±0.2a	17.5±5.0a
GSOD II	375.0±115.0d	2.96±0.4a	15.9±4.8a
p-valor entre grupos	0.4630	0.1658	0.2433

Médias seguidas da mesma letra, na linha, não diferem estatisticamente entre si ($p > 0,05$)

A peroxidação lipídica e a mensuração de espécies reativas de oxigênio (ROS) não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos (tabela 3). Apesar da análise de variância (ANOVA) ter indicado diferença em pelo menos uma das médias, quando mensurada a produção de malondialdeído (MDA) nas amostras.

5.5. DISCUSSÃO

A produção de ROS é altamente prejudicial às células espermáticas, devido à alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados presente nessas células. Devido a isso, a adição de antioxidantes ao diluente do sêmen está sendo muito estudada, de modo que se consiga reduzir os impactos negativos ocasionados por essas substâncias aos espermatozoides (MICHAEL et al., 2007).

Os parâmetros cinéticos mais influenciados pela adição dos antioxidantes utilizados foram MT e MP, ALH, STR, LIN e VCL. As motilidades, total (MT) e progressiva (MP), foram influenciadas negativamente com a adição dos antioxidantes. A adição da superóxido dismutase na dose de 500 U/mL (GSOD II) ocasionou redução das MT e MP, que também foi observado no sêmen criopreservado de galos (AMINI et al., 2015).

Porém, quando adicionou-se essa enzima na dose de 500 U/mL associada a 1,0 mM de glutathione redutase (GSH), no sêmen refrigerado bovino, observou-se melhora na motilidade espermática, após 24 horas de armazenamento (FOOTE et al., 2002). Ainda, outro estudo realizado no sêmen refrigerado de galos, também demonstrou uma melhora das MT e MP, quando adicionado 200 U/mL de superóxido dismutase (PARTYKA et al., 2013).

Da mesma maneira, quando se adicionou ácido ascórbico (GAC I) obteve-se redução da MT, diferindo-se do que foi demonstrado por HU et al. (2010) em bovinos e por MEMON et al. (2012) em caprinos. A atividade antioxidantes está relacionada com a diferença de susceptibilidade entre espécies e raças (MEMON et al., 2012), e também, nas diferenças entre os procedimentos realizados para a criopreservação (TULI & HOLTZ, 1994).

A amplitude de deslocamento lateral de cabeça dos espermatozoides (ALH) foi reduzida com adição do ácido ascórbico (AC I e AC II). Isso pode ser considerado uma alteração positiva, uma vez que maiores valores de ALH interferem negativamente na progressão dessas células (ARRUDA, 2000). Ainda, é considerado um indicador do movimento de hiperativação característico da capacitação espermática (AUGER et al., 1989). Porém, esses resultados contrariam com os encontrados por HU et al. (2010) e MEMON et al. (2012), que demonstraram que o ácido ascórbico proporcionou aumento da ALH dessa células.

O antioxidantes enzimático (GSOD I) aumentou os valores de ALH, que pode ocasionar prejuízos na capacidade de fertilização dos espermatozoides (ARRUDA, 2000). Isso está de acordo com os resultados encontrados por AMINI et al. (2015), que verificaram que, no sêmen criopreservado de galos, as doses

mais elevadas de SOD (200 e 300 U/mL) não apresentaram variações nos seus valores de ALH.

Já a retilinearidade (STR) e a linearidade (LIN) foram influenciadas negativamente pela SOD na dose de 250 U/mL (GSOD I), quando comparado ao ácido ascórbico (GAC II). AMINI et al. (2015) relataram que a dose mais elevada de SOD utilizada (300 U/mL) também reduziu os valores de STR e LIN, no sêmen criopreservado de galos. Isso foi demonstrado também no sêmen refrigerado de galos, com adição de 200 U/mL, que obteve menores valores desses parâmetros (PARTYKA et al., 2013).

O ácido ascórbico (GAC II) elevou a STR e LIN, pressupondo-se que ocorreu uma seleção dos espermatozoides mais fracos e imóveis, fazendo com que o CASA demonstre um “pseudo-aprimoramento” dos parâmetros cinéticos, demonstrando esse aumento (KATKOV & LULAT, 2000).

Da mesma maneira que os parâmetros anteriores, o GSOD I apresentou valores superiores de velocidade total dos espermatozoides, em relação ao ácido ascórbico (GAC I e GAC II). Isso difere dos resultados encontrados por AMINI et al. (2015) e PARTYKA et al. (2013), que demonstraram que a adição da SOD não melhorou a VCL dos espermatozoides. Elevação da VCL e da ALH, juntamente com a diminuição da LIN, como observado no GSOD I, são indicativos de hiperativação, que influencia nas características do movimento flagelar dessas células, e significa que o espermatozoide atingiu o estágio de capacitação (MORTIMER, 1997; VERSTEGEN et al., 2002; MARQUEZ & SUAREZ, 2007; SOUSA, 2007).

Já o ácido ascórbico (GAC I e GAC II) demonstrou redução dos valores de VCL, o que difere dos resultados encontrados por HU et al. (2010) e MEMON et al. (2012). Essa redução pode ser devido a uma falha na atividade antioxidante, como também pela indução de um dano mitocondrial durante a criopreservação do sêmen (BUDWORTH et al., 1987; BARLOW et al., 1991).

Nesse estudo, tanto a velocidade retilínea (VSL) quanto a velocidade média (VAP) dos espermatozoides não apresentou diferença estatística significativa. Esses dois parâmetros são importantes para estimar a fertilidade

do sêmen de reprodutores, uma vez que apresentam alta correlação com a capacidade de fertilização das células espermáticas (KATHIRAVAN et al., 2008).

A morfologia espermática e a integridade de membrana, associadas com a motilidade dos espermatozoides, estão estritamente correlacionadas com a peroxidação lipídica, que ocasiona séria disfunção espermática (MAIA & BICUDO, 2009). Não foram observadas variações significativas nos grupos analisados, supondo-se que os antioxidantes não foram capazes de controlar ou reverter essa alteração. Porém, já foi demonstrado que o ácido ascórbico no sêmen criopreservado bovino melhorou o percentual de espermatozoides com membrana intacta e a integridade de acrossoma (HU et al., 2010). Também, outros antioxidantes já demonstraram eficácia nessas características, como inositol, metionina e carnitina (BUCAK et al., 2010).

A combinação de antioxidantes adicionados aos meios diluidores foi demonstrada mais eficiente que a utilização dos mesmos sozinhos, melhorando a qualidade do sêmen criopreservado (ROSSI et al., 2001; GADEA et al., 2007; CÂMARA et al., 2011). Sendo o MDA considerado um biomarcador resultante da peroxidação lipídica na membrana espermática, os antioxidantes deveriam controlar, reverter ou neutralizar a produção de ROS, e conseqüentemente, demonstrar redução nas concentrações de MDA, no teste espectrofotômetro TBARS (FRAGA et al., 1996). Isso não foi observado nesse trabalho, supondo-se que os antioxidantes não foram capazes de realizar suas ações de maneira adequada.

A capacidade antioxidante total (TAC) mensurada pelo FRAP, foi maior nos grupos com adição de ácido ascórbico, que pode ter sido influenciado pela utilização dessa mesma molécula como substância controle para a realização do teste, porém não há estudos testando a relação da TAC com esses antioxidantes. Em trabalho testando-se a adição de isoespintanol e timol no sêmen criopreservado equino não observou diferença significativa desse parâmetro (BETANCUR & ROJANO, 2016). Da mesma maneira, a suplementação de ácido elágico na dieta de galos, nas apresentou diferenças significativas na TAC do sêmen desses animais (SHANMUGAM & RAO, 2015).

5.6. CONCLUSÕES

Nesse estudo, foi observado que tanto o antioxidante enzimático quanto o sintético não melhoraram os parâmetros cinéticos do sêmen, e não conseguiram reduzir o estresse oxidativo ocasionado pela criopreservação, quando adicionado ao diluente Optxcell®. Sugere-se que seja testado essas doses no sêmen criopreservado bovino com outros diluentes.

5.7. REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; SALEH, R. A.; BEDAIWY, M. A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and Sterility**, v. 79(4), p. 829-43, 2003.

AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 3, p. 1–21, 2005.

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 3, p. 145–173, 1987.

AMINI, M. R.; KOHRAM, H.; SHAHANEH, A. Z.; ET AL. The effects of different levels of catalase and superoxide dismutase in modified Beltsville extender on rooster post-thawed sperm quality. **Cryobiology**, v. 70, p. 226-232, 2015.

ARRUDA, R. P. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). **Tese (Livre docência) – Faculdade de Medicina Veterinária de Zootecnia, Universidade de São Paulo**, São Paulo, 121 f., 2000.

AUGER, J.; RNOT, X.; DADOUNE, J. P. Human sperm mitochondrial function related to motility: a flow and image cytometric assessment. **Journal of Andrology**. V. 10, n.6.439-448, 1989.

BANSAL, A. K.; BILASPURI, G. S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, 7 f., 2010.

BAJZERT, J.; ŁUKASZEWICZ, E.; OCHOTA, M. The effect of cysteine and superoxide dismutase on the quality of post-thawed chicken sperm. **Cryobiology**, v.67, p.132-136, 2013.

BARLOW, P.; DELVIGNE, A.; VAN DROMME, J. Predictive value of classical and automated sperm analysis for in vitro fertilization. **Human Reproduction**, v. 6, 119–124, 1991.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.

BETANCUR, G. R.; ROJANO, B. A. Efecto del isoespintanol y el timol en la actividad antioxidante de semen equino diluido con fines de congelación. **Revista de Medicina Veterinaria**, n. 35, p. 149–158, 2017.

BORGES, J. C.; SILVA, M. R.; GUIMARÃES, J. D.; ET AL. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35(3), p. 303–314, 2011.

BUCAK, M. N.; TUNCER, P. B.; SARIÖZKAN, S.; ET AL. Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: Antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. **Cryobiology**, v. 61, n. 3, p. 248–253, 2010.

BUDWORTH, P. R.; AMANN, R. P. HAMMERSTEDT, R. H. A microcomputer-photographic method for evaluation of motility and velocity of bull sperm. **Journal of Dairy Science**, v. 70, 1927–1936, 1987.

CÂMARA, D.; MELLO-PINTO, M.; PINTO, L.; ET AL. Effects of reduced glutathione and catalase on the kinematics and membrane functionality of sperm during liquid storage of ram semen. **Small Ruminant Research**, v. 100, 44–49, 2011.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. **CBRA**, Belo Horizonte, 3ed., 2013.

EIDAN, S. M. Effect on post-cryopreserved semen characteristics of Holstein bulls of adding combinations of vitamin C and either catalase or reduced glutathione to Tris extender. **Animal Reproduction Science**, v. 167, p. 1–7, 2016.

FOOTE, R. H.; BROCKETT, C. C.; KAPROTH, M. T. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v. 71, p. 13–23, 2002.

FRAGA, C. G.; MOTCHNIK, P. A.; WYROBEK, A. J.; ET AL. Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 13, 199–203, 1996.

GADEA, J.; GUMBAO, D.; NOVAS, S. C.; ET AL. Supplementation of the dilution medium after thawing with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of frozen–thawed bull spermatozoa. **Andrology**, v.7, 1–10, 2007.

GALLEGO, A. M. Avaliação das características da motilidade (CASA), morfologia e funcionalidade da membrana plasmática (HOST) de espermatozoides bovinos sexados por citometria de fluxo. **Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo**, 118 f., 2010.

HU, J.; TIAN, W.; ZHAO, X.; ET AL. The cryoprotective effects of ascorbic acid supplementation on bovine semen quality. **Animal Reproduction Science**, v. 121, n. 1–2, p. 72–77, 2010.

JANUSKAUSKAS, A.; GIL, J.; SÖDERQUIST, L.; ET AL. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. **Theriogenology**, v. 52, p. 641-658, 1999.

KATHIRAVAN, P.; KALATHARAN, J.; EDWIN, M. J.; ET AL. Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with in vitro fertility in zona-free hamster oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p. 9-17, 2008.

KATKOV, I. I.; LULAT, A. G. Do conventional CASA parameters reflect recovery of kinematics after freezing? CASA paradox in the analysis of recovery of spermatozoa after cryopreservation. **CryoLetters, c/o Royal Veterinary College**, v. 21, p. 141–148, 2000.

LOETCHUTINAT, C.; KOTHAN, S.; DECHSUPA, S.; ET AL. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 72, p. 323–331, 2005.

MAIA, M. S.; BICUDO, S. D.; AZEVEDO, H. C. A.; ET AL. Efeito da adição de lauril sulfato de sódio (OEP) ao diluidor na viabilidade do sêmen congelado de ovinos Santa Inês. **Veterinária e Zootecnia**. Botucatu, v. 15, n. 3, p. 521-530, 2008.

MARQUEZ, B.; SUAREZ, S. S. Bovine sperm hyperactivation is promoted by alkaline-stimulated Ca²⁺ influx. **Biology of Reproduction**, v. 76, p. 600-665, 2007.

MEMON, A. A.; WAHID, H.; ROSNINA, Y.; ET AL. Effect of ascorbic acid concentrations, methods of cooling and freezing on boar goat semen cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, 2012.

MICHAEL, A.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E.; ET AL. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 68, n. 2, p. 204–212, 2007.

MICHAEL, A. J.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E. A.; ET AL. Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive

oxygen species of chilled canine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 112, p. 119–135, 2009.

MORTIMER, S. T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**. v. 3, p.403-439, 1997.

PARTYKA, A.; NIZAŃSKI, W.; BAJZERT, J.; ŁUKASZEWICZ, E.; OCHOTA, M. The effect of cysteine and superoxide dismutase on the quality of post-thawed chicken sperm. **Cryobiology**, v. 67, n. 2, p. 132–136, 2013.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal-tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v.95, p 351–358, 1979.

PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 63, n. 3, p. 215–225, 2006.

ROSSI, T.; MAZZILLI, F.; DELFINO, M.; ET AL. Improved human sperm recovery using superoxide dismutase and catalase supplementation in semen cryopreservation procedure. **Cell Tissue Bank**. v. 2, 9–13, 2001.

SANTIANI, A.; EVANGELISTA, S.; VALDIVIA, M.; ET AL. Effect of the addition of two superoxide dismutase analogues (Tempo and Tempol) to alpaca semen extender for cryopreservation. **Theriogenology**, v. 79, n. 5, p. 842–846, 2013.

SHANMUGAM, M.; RAMA RAO, S. V. Effect of dietary ellagic acid supplementation on semen quality parameters in chickens. **Animal Production Science**, v. 55, n. 1, p. 107–112, 2015.

SHARMA, R. K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, v. 4295, n. 96, p. 835–850, 1996.

SIKKA, C.; ORLEANS, N. Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Male Infertility Minireview. **Journal of Andrology**, v. 16, n. 6, p. 464–468, 1995.

SILVA, L. C. G.; ASSUMPC, M. Influence of Ascorbic Acid and Glutathione Antioxidants on Frozen-Thawed Canine Semen. **Reproduction in Domestic Animals** , v. 44, p. 359–362, 2009.

SOUZA, A. H.; SARTORI, R.; GUENTHER, J. N.; ET AL. Effect of semen source and dose FSH on superovulatory response and embryo production in Holstein heifers. **Animal Reproduction**. v. 4, p.70-76, 2007.

TULI, R. K.; HOLTZ, W. Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and GOTrelease from Boer goat spermatozoa. **Theriogenology**, v. 42, 547–555, 1994.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in Andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**. v. 57, 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.1(4), p. 871-891, 1995.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A adição de antioxidantes nos diluentes utilizados para a criopreservação do sêmen representa o principal aprimoramento a ser instituído para melhorar essa biotecnologia. Apesar de ainda serem necessários estudos para verificação da dose ideal, as associações que podem ser realizadas entre antioxidantes (enzimáticos e sintéticos), e quais realmente aperfeiçoarão a qualidade espermática e a viabilidade do sêmen.

Desse modo, verificou-se no presente estudo, que os antioxidantes utilizados que foram adicionados ao diluente sem proteína de origem animal, não melhoraram a motilidade das células espermáticas. Porém, o antioxidante enzimático na dose de 250 U/mL proporcionou aumento nos valores de ALH, que está relacionada com a capacidade de fertilização dos espermatozoides, e VCL, que é a velocidade da trajetória real das células espermáticas. Essas duas características, juntamente com redução na LIN, indicam a hiperativação das células espermáticas.

Já a dose de 500 U/mL de superóxido dismutase não apresentou efeitos deletérios ao sêmen, porém não conseguiu melhorar a cinética espermática e reduzir o estresse oxidativo do sêmen.

O ácido ascórbico apresentou melhores valores de STR e LIN, em ambas doses, possivelmente pela seleção de espermatozoides fracos e imóveis. Com relação a peroxidação lipídica, não apresentou diferenças significativas nos seus resultados, demonstrando que não conseguiu exercer sua ação de maneira adequada.

O único parâmetro bioquímico que apresentou diferenças significativas foi o potencial antioxidante (FRAP), sendo que os grupos tratamentos contendo ácido ascórbico demonstraram maior TAC, porém não é possível constatar que realmente existe uma melhora na atividade antioxidante do meio diluidor, devido a utilização dessa mesma molécula como substância controle para realização do teste..

Contudo, como já mencionado, são necessários mais estudos para a verificação da ação desses antioxidantes no sêmen criopreservado em diferentes meios diluidores, e quais doses seriam as ideais para sua eficiência.

7. REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; SALEH, R. A.; BEDAIWY, M. A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and Sterility**, v. 79(4), p. 829-43, 2003.

AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 3, p. 1–21, 2005.

AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S.; UNIT, R. B.; ET AL. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species human spermatozoa. **Journal of Reproduction & Fertility**, n. 81, p. 459-469, 1987.

AITKEN, R.J., WEST, K.M. Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leukocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. **International Journal of Andrology**, v. 13, p. 433-451, 1990.

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 & Fertility**, n. 97, p. 441-450, 1993.

AITKEN, R. J.; FISHER, H. M.; FULTON, N.; ET AL. Reactive Oxygen Species Generation by Human Spermatozoa Is Induced by Exogenous NADPH and Inhibited by the Flavoprotein Inhibitors Diphenylene Iodonium and Quinacrine. **Molecular Reproduction and Development**, v. 482, p. 468–482, 1997.

AITKEN, R. J.; SAWYER, D. The human spermatozoon - not waving but drowning. **Advances in Male Mediated Developmental Toxicity**, p. 85-86, 2003.

AITKEN, R. J.; DE IULIIS, G. N.; FINNIE, J. M.; ET AL. Analysis of the relationships between oxidative stress, DNA damage and sperm vitality in a patient population: development of diagnostic criteria. **Human Reproduction**, v. 25, p. 2415-2426, 2010.

AISEN, E.G.; ALVAREZ, H.L.; VENTURINO, A.; ET AL. Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. **Theriogenology**, n. 53, p. 1053-1061, 2000.

AKHTER, S.; ANSARI, M. S.; RAKHA, B. A.; ET AL. Effect of low density lipoproteins in extender on freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen. **Theriogenology**, v. 76, n. 4, p. 759–764, 2011.

ALVAREZ, C.; STOREY, T.; TOUCHSTONE, C. Spontaneous Hydrogen Superoxide Enzyme Lipid Peroxide Dismutase Peroxidation and Production in Human of Spermatozoa and Superoxide as Major Against Oxygen Toxicity. **Journal of Andrology**, p. 338– 348, 1978.

ALVAREZ, J. G.; SHARMA, R. K.; OLLERO, M.; ET AL. Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin. **Fertility and Sterility**, v. 78, n. 2, p. 319–329, 2002.

ALVAREZ, C. A.; MORAES, G. V. DE. Efeitos Da Selenometionina E Vitamina C Sobre O Sêmen. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 1, n. 1, p. 45–51, 2006.

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 3, p. 145–173, 1987.

AMINI, M. R.; KOHRAM, H.; SHAHANEH, A. Z.; ET AL. The effects of different levels of catalase and superoxide dismutase in modified Beltsville extender on rooster post-thawed sperm quality. **Cryobiology**, v. 70, p. 226-232, 2015.

ANANE, R.; CREPPY, E. E. Lipid peroxidation as pathway of aluminium cytotoxicity in human skin fibroblast cultures: Prevention by superoxide dismutase plus catalase and vitamins E and C. **Human & Experimental Toxicology**, v. 20, n. 9, p. 477–481, 2001.

ANDRADE, E. R.; MELO-STERZA, F. A.; SENEDA, M. M.; ET AL. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 2, p. 79–85, 2010.

ANSARI, M. S.; RAKHA, B. A.; AKHTER, S.; ET AL. Optxcell improves the postthaw quality and fertility of buffalo bull sperm. **Theriogenology**, v. 85, n. 3, p. 528–532, 2016.

ANSARI, M. S.; RAKHA, B. A.; AKHTER, S. Cryopreservation of bull semen in OptiXcell® and conventional extenders: Comparison of semen quality and fertility. **Animal Science Papers and Reports**, v. 35, n. 3, p. 317–328, 2017.

ARRUDA, R. P. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). **Tese (Livre docência) – Faculdade de Medicina Veterinária de Zootecnia, Universidade de São Paulo**, São Paulo, 121 f., 2000.

AUGER, J.; RNOT, X.; DADOUNE, J. P. Human sperm mitochondrial function related to motility: a flow and image cytometric assessment. **Journal of Andrology**. V. 10, n.6.439-448, 1989.

AYDEMIR, B.; KIZILER, A. R.; ONARAN, I.; ET AL. Impact of Cu and Fe concentrations on oxidative damage in male infertility. **Biological Trace Element Research**, v. 112, n. 3, p. 193–203, 2006.

BAILEY, J. L. Semen Cryopreservation in Domestic Animals : A Damaging and Capacitating Phenomenon. **Journal of Andrology** v. 21, n. 1, 2000.

BAJZERT, J.; ŁUKASZEWICZ, E.; OCHOTA, M. Cryobiology The effect of cysteine and superoxide dismutase on the quality of post-thawed chicken sperm. **Cryobiology**, v. 67, p. 132-136, 2013.

BANSAL, A. K.; BILASPURI, G. S. Impacts of oxidative stress and antioxidants on semen functions. **Veterinary Medicine Internation**, v. 2011, 7 f., 2010.

BARLOW, P.; DELVIGNE, A.; VAN DROMME, J. Predictive value of classical and automated sperm analysis for in vitro fertilization. **Hum. Reprod.** v. 6, 119–124, 1991.

BATHGATE, R.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G. Studies on the Effect of Supplementing Boar Semen Cryopreservation Media with different avian egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, p. 68–73, 2006.

BENMOULA, A.; ALLAI, L.; BADI, A.; ET AL. Effect of extender and storage temperature on sperm motility parameters of liquid ram semen. **Revue Marocaine des Sciences Agronomiques et Vétérinaires**, v. 6, n. 2, p. 211–219, 2018.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.

BETANCUR, G. R.; ROJANO, B. A. Efecto del isoespintanol y el timol en la actividad antioxidante de semen equino diluido con fines de congelación. **Revista de Medicina Veterinaria**, , n. 35, p. 149–158, 2017.

BILODEAU, J. F.; CHATTERJEE, S.; SIRARD, M. A.; ET AL. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, n. 3, p. 282–288, 2000.

BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO, A. L.; SANTOS, A. D. F.; ET AL. Utilização De Glicerol E Etilenoglicol como crioprotetores na congelação do sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira**, v. 5, p. 27–32, 2004.

BORGES, J. C.; SILVA, M. R.; GUIMARÃES, J. D.; ET AL. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35(3), p. 303–314, 2011.

BUCAK, M. N.; ATESSAHIN, A. Y. A. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. **Small Ruminant Research**, v. 75(2-3), p. 128-34, 2007.

BUCAK, M. N.; SARIÖZKAN, S.; TUNCER, P. B.; ET AL. Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities in Angora goat semen following cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 81(2-3), p. 90-5, 2008.

BUCAK, M. N.; TUNCER, P. B.; SARIÖZKAN, S.; ET AL. Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: Antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. **Cryobiology**, v. 61, n. 3, p. 248–253, 2010.

BUDWORTH, P. R.; AMANN, R. P. HAMMERSTEDT, R. H. A microcomputer-photographic method for evaluation of motility and velocity of bull sperm. **J. Dairy Sci.** v. 70, 1927–1936, 1987.

CÂMARA, D.; MELLO-PINTO, M.; PINTO, L.; ET AL. Effects of reduced glutathione and catalase on the kinematics and membrane functionality of sperm during liquid storage of ram semen. **Small Rumin. Res.** v. 100, 44–49, 2011.

CASTRO, L. S. Efeito do estresse oxidativo no espermatozoide e relação com o desenvolvimento embrionário. **Universidade de São Paulo**, 66 f. 2014.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. **CBRA**, Belo Horizonte, 3ed., 2013.

DOSHI, S.B.; KHULLAR, K.; SHARMA, R.K.; ET AL. Role of reactive nitrogen species in male infertility. **Reproductive Biology**, v.10, p. 109, 2012.

DURU, N. K.; MORSHEDI, M.; OEHNINGER, S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human. **Fertility & Sterility** , v. 74, n. 6, 2000.

EIDAN, S. M. Effect on post-cryopreserved semen characteristics of Holstein bulls of adding combinations of vitamin C and either catalase or reduced glutathione to Tris extender. **Animal Reproduction Science**, v. 167, p. 1–7, 2016.

EL-BELTAGI, H. S.; MOHAMED, H. I. Reactive Oxygen Species , Lipid Peroxidation and Antioxidative Defense Mechanism. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 41, n. 1, p. 44–57, 2013.

EVANS, G. Current Topics in Artificial Insemination of Sheep. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 41 (1), p. 103-116, 2006.

FLAHERTY, C. O.; BECONI, M., BEORLEGUI, N. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. **Andrologia** , v. 275, p. 269–275, 1997.

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

FERREIRA, F. M.; WENTZ, I.; SCHEID, I. R.; ET AL. Comportamento de monta e características seminais de suínos jovens landrace e large white. **Ciência Rural**, v. 35, n. 1, p. 131–137, 2005.

FICKEL, J.; WAGENER, A.; LUDWIG, A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. **European Journal of Wildlife Research**, v.53, p. 81-89, 2007.

FOOTE, R. H.; BROCKETT, C. C.; KAPROTH, M. T. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v. 71, p. 13–23, 2002.

FOROUZANFAR, M.; SHARAFI, M.; HOSSEINI, S. M.; et al. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. **Theriogenology**, v. 73, n. 4, p. 480-7, 2010.

FOULKES, J. A.; SWEASEY, D.; GOODEY, R. G. Fertility of bull spermatozoa in egg-yolk diluents of varied lipid fatty acid composition. **Journal of Reproduction & Fertility**, v. 60, p. 165-169, 1980.

FRAGA, C. G.; MOTCHNIK, P. A.; WYROBEK, A. J.; ET AL. Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. **Mutat. Res.** v. 13, 199–203, 1996.

GADEA, J.; GUMBAO, D.; NOVAS, S. C.; ET AL. Supplementation of the dilution medium after thawing with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of frozen–thawed bull spermatozoa. **Andrology**. v.7, 1–10, 2007.

GADEA, J.; SELLÉS, E.; MARCO, M. A.; et al. 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, n. 3–4, p. 690–701, 2004.

GALLEGO, A. M. Avaliação das características da motilidade (CASA), morfologia e funcionalidade da membrana plasmática (HOST) de espermatozoides bovinos sexados por citometria de fluxo. **Programa de Pós-graduação em Reprodução**

Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 118 f., 2010.

GARCEZ, M. E. S. Efeito do resveratrol e do ácido ascórbico na criopreservação de sêmen humano. **Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul**, 113 f., 2011.

GARRIDO N.; MESEGUER M.; SIMON C.; ET AL. Proxidative and antioxidative imbalance in human semen and its relation with male infertility. **Asian Journal of Andrology**, v. 6, p. 59-65, 2004.

GLAZAR, A. I.; MULLEN, S. F.; LIU, J.; ET AL. Osmotic tolerance limits and membrane permeability characteristics of stallion spermatozoa treated with cholesterol. **Cryobiology**, v. 59, n. 2, p. 201–206, 2009.

GONÇALVES, F. S.; BARRETO, F. S. S.; ARRUDA, R. P.; ET AL. Effect of antioxidants during bovine in vitro fertilization procedures on spermatozoa and embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45 (1), p. 129-35, 2010.

GONZÁLEZ-MARÍN, C.; GOSÁLVEZ, J.; ROY, R. Types , Causes , Detection and Repair of DNA Fragmentation in Animal and Human Sperm Cells. **Intenational Journal of Molecular Sciences**, p. 14026–14052, 2012.

GRAHAM, J. K.; FOOTE, R. H. Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. **Cryobiology**, v. 24, n. 1, p. 42–52, 1987.

GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R. Effects of reactive oxygen species on sperm function. **Theriogenology**, v. 78, p-1700-8, 2012.

HIDALGO, M.; DORADO, J.; RODRI, I. Cryopreservation of goat spermatozoa : Comparison of two freezing extenders based on post-thaw sperm quality and fertility rates after artificial insemination. **Theriogenology**, v. 68, p. 168–177, 2007.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science** , p. 3–22, 2000.

HOSSEIN, M. S.; HASHEM, M. A.; JEONG, Y. W.; ET AL. Temporal effects of α -tocopherol and l-ascorbic acid on in vitro fertilized porcine embryo development. **Animal Reproduction Science**, v. 100, n. 1–2, p. 107–117, 2007.

HU, J.; TIAN, W.; ZHAO, X.; ET AL. The cryoprotective effects of ascorbic acid supplementation on bovine semen quality. **Animal Reproduction Science**, v. 121, n. 1–2, p. 72–77, 2010.

JANUSKAUSKAS, A.; GIL, J.; SÖDERQUIST, L.; ET AL. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. **Theriogenology**, v. 52, p. 641-658, 1999.

KALELI, S., ÖÇER, F., IREZ, T., BUDAK, E. Does leukocytospermia associate with poor semen parameters and sperm functions in male infertility ? The role of different seminal leukocyte concentrations. **European Jorunal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 89, p. 185–191, 2000.

KANKOFER, M.; KOLM, G.; AURICH, J.; ET AL. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5°C. **Theriogenology**, v. 63, n. 5, p. 1354–1365, 2005.

KATHIRAVAN, P.; KALATHARAN, J.; EDWIN, M. J.; VEERAPADIAN, C. Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its

relationship with in vitro fertility in zona-free hamster oocytes. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 104, p. 9-17, 2008.

KATKOV, I. I.; LULAT, A. G. Do conventional CASA parameters reflect recovery of kinematics after freezing? CASA paradox in the analysis of recovery of spermatozoa after cryopreservation. **Cryo Lett.** 21, 141–148, 2000.

KEHRER, J. P. The Haber – Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology** , v. 149, p. 43–50, 2000.

KUNDU, C. N.; CHAKRABORTY, J.; DUTTA, P.; ET AL. Effects of dextrans on cryopreservation of goat cauda epididymal spermatozoa using a chemically defined medium. **Reproduction**, v. 123, p. 907–913, 2002.

LICI, B. U. A.; ZKARA, H. A. O. Impact of Cu and Fe Concentrations on Oxidative Damage in Male Infertility. **Biological Trace Element Research** , v. 112, p. 193–203, 2006.

LIMA-VERDE, I. B.; JOHANNISSON, A.; NTALLARIS, T.; ET AL. Effect of freezing bull semen in two non-egg yolk extenders on post-thaw sperm quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, n. 1, p. 127–136, 2018.

LIPAR, J. L.; KETTERSON, E. D.; NOLAN, V.; ET AL. Egg yolk layers vary in the concentration of steroid hormones in two avian species. **General and Comparative Endocrinology**, v. 115, n. 2, p. 220–227, 1999.

LOETCHUTINAT, C.; KOTHAN, S.; DECHSUPA, S.; ET AL. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate assay. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 72, p. 323–331, 2005.

LUCK, M. R.; JEYASEELAN, I.; SCHOLLES, R. A. Ascorbic acid and fertility. **Biology of reproduction**, v. 52, n. 2, p. 262–266, 1995.

MACHLIN, J. Oxidation of α -Tocopherol model compound by Superoxide. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 689, n. 10, p. 684–689, 2000.

MAIA, M. S.; BICUDO, S. D.; AZEVEDO, H. C. A.; ET AL. Efeito da adição de lauril sulfato de sódio (OEP) ao diluidor na viabilidade do sêmen congelado de ovinos Santa Inês. **Veterinária e Zootecnia**. Botucatu, v. 15, n. 3, p. 521-530, 2008.

MARQUEZ, B.; SUAREZ, S. S. Bovine sperm hyperactivation is promoted by alkaline-stimulated Ca^{2+} influx. **Biology of Reproduction**, v. 76, p.600-665, 2007.

MAXWELL, W.M.C., WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science** , v. 42, p. 55-65, 1996.

MEDEIROS, A. S. L. Utilização de diferentes tipos de amidas como agentes crioprotetores para espermatozoides de garanhões. **Universidade Estadual Paulista**, 2003.

MEMON, A. A.; WAHID, H.; ROSNINA, Y.; ET AL. Effect of ascorbic acid concentrations, methods of cooling and freezing on boar goat semen cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**. 2012.

MICHAEL, A.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E.; ET AL. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 68, n. 2, p. 204–212, 2007.

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

MORTIMER, S. T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**. v. 3, p.403-439, 1997.

MUINO, R.; FERNÁNDEZ, M.; PEÑA, A. I. Post-thaw survival and longevity of bull spermatozoa frozen with na egg yolk-based or two egg yolk-free extenders after na equilibration period of 18 h. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 3, p-305-11, 2007.

NAIR, S. J.; BRAR, A. S.; AHUJA, C. S.; ET AL. A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. **Animal Reproduction Science**, v. 96, n. 1–2, p. 21–29, 2006.

NAZ, S.; UMAIR, M.; IQBAL, S. Comparison of Tris egg yolk-based, Triladyl® and Optixell® extender on post-thaw quality, Kinematics and in vivo fertility of Nili Ravi Buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. **Andrologia**, v. 50, n. 8, p. 1–6, 2018.

NISHIKIMI, M.; MACHLIN, L. J. Oxidation of α -tocopherol model compound by superoxide anion. **Arch Biochem Biophys**, v.170, p.684-689, 1975.

NKOMA, B.; SHERBROOKE, D. Spermiogenesis and DNA Repair : A Possible Etiology of Human Infertility and Genetic Disorders. **Systems Biology in Reproductive Medicine** , p. 3–10, 2008.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system¹ ¹This review is based on the licentiate thesis “Thioredoxin reductase—interactions with the redox active compounds 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and lipoic acid” by Jonas Nordberg,. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287–1312, 2001.

OCHSENDORF, F. R. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. **Human Reproduction Update**, v. 5, n. 5, p. 399–420, 1999.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal-tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v.95, p 351–358, 1979.

O'FLAHERTY, C.; BECONI, M.; BEORLEGUI, N. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. **Andrologia**, v. 29, n. 5, p. 269–275, 1997.

OLLERO, M.; LOPEZ, M. C.; SHARMA, R. K.; ET AL. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. **Human Reproduction**, v. 16, n. 9, p. 1922–1930, 2001.

PACE., M.M.; GRAHAM, E. F. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. **Journal of Animal Science**, v. 39, n. 6, 1974.

PARTYKA, A.; NIZAŃSKI, W.; BAJZERT, J.; ET AL. The effect of cysteine and superoxide dismutase on the quality of post-thawed chicken sperm. **Cryobiology**, v. 67, n. 2, p. 132–136, 2013.

PASQUALOTTO, F. F.; PASQUALOTTO, E. B.; UMEZU, F. DE M.; SALVADOR, M. Atividades da superóxido-dismutase e catalase no sêmen de homens férteis e inférteis. **Revista da AMRIGS**, v. 50, n. 5, p. 130–134, 2006.

PUGLIESI, G.; DE CARVALHO, G. R.; RATES, D. M.; ET AL. Viability and fertility of cooled equine semen diluted with skimmed milk or glycine egg yol-based extenders. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41. n. 12, p. 2411-2417, 2012.

PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 63, n. 3, p. 215–225, 2006.

QUINN, P. J.; CHOW, P. Y. W.; WHITE, I. G. From Cold Shock At a Plasma Membrane Site. **Cryobiology**, 2006.

ROSSI, T.; MAZZILLI, F.; DELFINO, M.; ET AL. Improved human sperm recovery using superoxide dismutase and catalase supplementation in semen cryopreservation procedure. **Cell Tissue Bank**. v. 2, 9–13, 2001.

SALAMON, S.; MAXWELL, W. M. C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 77-111, 2006.

SALEH, R. A.; AGARWAL, A.; KANDIRALI, E. Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. **Fertility and Sterility** , v. 78, n. 6, 2002.

SANOCKA, D.; KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, p. 12, 2004.

SANTIANI, A.; EVANGELISTA, S.; VALDIVIA, M.; ET AL. Theriogenology Effect of the addition of two superoxide dismutase analogues (Tempo and Tempol) to alpaca semen extender for cryopreservation. **Theriogenology**, v. 79, n. 5, p. 842–846, 2013.

SARIÖZKAN, S.; NUMAN, M.; BARBAROS, P.; ET AL. The influence of cysteine and taurine on microscopic – oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. **Cryobiology**, v. 58, p. 134–138, 2009.

SEIDMAN, M. D.; KHAN, M. J.; TANG, W. X.; ET AL. Influence of lecithin on mitochondrial DNA and age-related hearing loss. **Otolaryngology-head and neck Surgery**, v. 127, n. 3, p. 138-144, 2002.

SELLE, E.; MARCO, M. A.; COY, P.; ET AL. 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.

SHANMUGAM, M.; RAMA RAO, S. V. Effect of dietary ellagic acid supplementation on semen quality parameters in chickens. **Animal Production Science**, v. 55, n. 1, p. 107–112, 2015.

SHARMA, R. K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, v. 4295, n. 96, p. 835–850, 1996.

SIKKA, C.; ORLEANS, N. Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Male Infertility Minireview. **Journal of Andrology**, v. 16, n. 6, p. 464–468, 1995.

SILVA, L. C. G.; ASSUMPC, M. Influence of Ascorbic Acid and Glutathione Antioxidants on Frozen-Thawed Canine Semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 359–362, 2009.

SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, p. 370–384, 2011.

SNOECK, P. P. N.; HENRY, M.; MELO, M. I. V. Efeito de diferentes diluidores sobre a viabilidade espermática pós-descongelção de sêmen eqüino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 59, n. 1, p. 56–64, 2007.

SOUZA, C. V. DE; BRANDÃO, F. Z.; SANTOS, J. D. R.; ET AL. Effect of different concentrations of L-carnitine in extender for semen cryopreservation in sheep. **Cryobiology**, v. 89, n. January, p. 104–108, 2019.

SOUZA, A. H.; SARTORI, R.; GUENTHER, J. N. ET AL. Effect of semen source and dose FSH on superovulatory response and embryo production in Holstein heifers. **Animal Reproduction**. v. 4, p.70-76, 2007.

STOREY, T. Assessment of Cell Damage Peroxidation Caused by Spontaneous Spermatozoa Lipid in Rabbit of Obstetrics. **Biology of Reproduction**, p. 323–331, 1984.

STOREY, B. T. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, n. 3, p. 203–213, 1997.

STRADAIOLI, G.; NORO, T.; SYLLA, L.; ET AL. Decrease in glutathione (GSH) content in bovine sperm after cryopreservation: Comparison between two extenders. **Theriogenology**, v. 67, n. 7, p. 1249–1255, 2007.

THOMAS, F. H.; LEASK, R.; SRŠEN, V.; ET AL. Effect of ascorbic acid on health and morphology of bovine preantral follicles during long-term culture. **Reproduction**, v. 122, n. 3, p. 487–495, 2001.

THUN, R.; HURTADO, M.; JANETT, F. Comparison of Biociphos-Plus 1 and TRIS-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. **Theriogenology**, v. 57, p. 1087–1094, 2002.

TULI, R. K.; HOLTZ, W. Effect of glycerolization procedure and removal of seminal plasma on post-thaw survival and GOT release from Boer goat spermatozoa. **Theriogenology**, 42, 547–555, 1994.

UCZAJ, W. Ł.; SKRZYDLEWSKA, E. L. Ż. B. DNA damage caused by lipid peroxidation products. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v.8, p. 391 – 413, 2003.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; ET AL. Free radicals , metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 160, p. 1–40, 2006.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; ET AL. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology** , v. 39, p. 44–84, 2007.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in Andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**. v. 57, 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. 1(4), p. 871-891, 1995.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 481–492, 2000.

WHITE, I. G. Lipids and Calcium Uptake of Sperm in Relation to Cold Shock and Preservation : a Review. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 5, p. 639-58, 2006.

WHITTINGTON, K.; FORD, W. C. L. Relative contribution of leukocytes and of spermatozoa to reactive oxygen species production in human sperm suspensions. **International Journal of Andrology** , v. 235, p. 229–235, 1999.

WRIGHT, C.; WRIGHT, C. Sperm DNA damage caused by oxidative stress : modifiable clinical , lifestyle and nutritional factors in male infertility. **Reproductive biomedicine online**, 2014. Reproductive Healthcare Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.02.004>>.

YOUSEF, M. I.; AWAD, T. I.; ELHAG, F. A.; ET AL. A. Study of the protective effect of ascorbic acid against the toxicity of stannous chloride on oxidative damage, antioxidant enzymes and biochemical parameters in rabbits. **Toxicology**, v. 235, n. 3, p. 194–202, 2007.

8. ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 086/2019, referente à pesquisa “**Medição da peroxidação lipídica e o efeito da superóxido dismutase e do ácido ascórbico como antioxidantes no sêmen congelado bovino**”, sob a responsabilidade de **Romildo Romualdo Weiss** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - BRASIL, com grau 1 de invasividade, em 11/12/2019.

Finalidade	Pesquisa científica
Vigência da autorização	Janeiro/2020 até Março/2020
Espécie/Linhagem	<i>Bos taurus</i> (bovino)/Aberdeen angus
Número de animais	5
Peso/Idade	900 kg/Adulto
Sexo	Macho
Origem	Renascer Biotecnologia, Uruguaiana/RS, Brasil.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 086/2019, regarding the research “**Measurement of lipid peroxidation and the effect of superoxide dismutase and ascorbic acid as antioxidants in frozen bovine semen**” under **Romildo Romualdo Weiss** supervision – which includes the production, maintenance and/or utilization of animals from Chordata phylum, Vertebrata subphylum (except Humans), for scientific or teaching purposes – is in accordance with the precepts of Law nº 11.794, of 8 October 2008, of Decree nº 6.899, of 15 July 2009, and with the edited rules from Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), and it was approved by the ANIMAL USE ETHICS COMMITTEE OF THE AGRICULTURAL SCIENCES CAMPUS OF THE UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (Federal University of Paraná, Brazil), with degree 1 of invasiveness, in session of 11/12/2019.

Purpose	Scientific research
Validity	January/2020 until March/2020
Specie/Line	<i>Bos taurus</i> (bovine)/Aberdeen angus
Number of animals	5
Weight/Age	900 kg/Adult
Sex	Male
Origin	Renascer Biotechnology, Uruguaiana/RS, Brazil.

Curitiba, 21 de janeiro de 2020

Chayane da Rocha

Chayane da Rocha

Coordenadora CEUA-SCA