

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

MARCOS ANTÔNIO CELESTINO DE SOUSA FILHO

EFEITO DA ADIÇÃO DO ÁCIDO PALMÍTICO E DA VITAMINA E AO DILUIDOR
TRIS-GEMA NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CANINO

Teresina, PI
2019

MARCOS ANTÔNIO CELESTINO DE SOUSA FILHO

EFEITO DA ADIÇÃO DO ÁCIDO PALMÍTICO E DA VITAMINA E AO DILUIDOR
TRIS-GEMA NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CANINO

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal.

Área de Concentração: Sanidade e Reprodução Animal

Orientador: Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Serviço de Processamento Técnico

S725e Sousa Filho, Marcos Antônio Celestino de
Efeito da adição do ácido palmítico e da vitamina e ao diluidor
tris-gema na criopreservação de sêmen canino. / Marcos Antônio
Celestino de Sousa Filho - 2019.
49 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Pro-
grama de Pós-graduação em Ciência Animal, Teresina, 2019.
Orientação: Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza

1. Cão 2. Sêmen 3. Antioxidantes 4. Ácido palmítico 5. Vita-
mina E 6. Criopreservação I. Título.

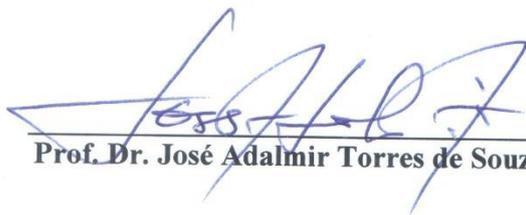
CDD 636.7

**EFEITO DA ADIÇÃO DO ÁCIDO PALMÍTICO E DA VITAMINA E NA
CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN CANINO**

MARCOS ANTONIO CELESTINO DE SOUSA FILHO

Dissertação aprovada em: 28/02/2019

Banca Examinadora:



Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza (Presidente) / DCCV/CCA/UFPI



Profa. Dra. Luanna Soares de Melo Evangelista (Interna) / CCS/UFPI



Prof. Dr. Marlon de Araújo Castelo Branco (Externo) / NASSAU

Dedico,

Aos meus pais (Marcos e Diana), às irmãs (Marília e Gabriela) à minha sobrinha (Cecília) e à minha namorada (Jessica) que me deram total apoio nessa caminhada, obrigado pela confiança e por essa conquista, que compartilho com vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que em todas as circunstâncias me guia e ilumina para agir racionalmente com ética e bom-senso, controlando cada passo, dando força, perseverança, sabedoria para que eu possa enfrentar os desafios da vida.

Agradeço a minha mãe, Maria Diana Rosa Rabêlo Medeiros de Sousa; ao meu pai, Marcos Antônio Celestino de Sousa; às minhas irmãs Marília Medeiros Celestino de Sousa e Gabriela Medeiros Celestino de Sousa por estarem sempre ao meu lado. A minha família, vó Rita por todo seu carinho, e meus avós paternos e padrinhos, vó Regina por sua força e vovô Aliomar por sua inteligência, tios e primos.

Agradecimento especial a minha namorada Jessica Facundes Feijó por estar comigo, pessoa amiga, amorosa, carinhosa e paciente. Obrigado por todo o apoio.

À Universidade Federal do Piauí, por me disponibilizar instrumentos e Corpo docente qualificado, equipamentos, Laboratórios e ambiente de estudo, equipamentos.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal pelo suporte prestado durante a realização do mestrado.

Ao CNPq por disponibilizar recursos financeiros, bolsa de fomento, durante o período da realização da Pós-graduação.

Agradecimento especial ao meu orientador, professor Dr. José Adalmir Torres de Souza, que me acolheu entre seus orientados.

À minha coorientadora Luanna Soares de Melo Evangelista por me apoiar nesse trabalho e inspirar o meu lado científico.

Aos membros do LBRA (Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal) com os quais convivo diariamente, amigos residentes, mestrandos e doutorandos, obrigado. Em especial aos amigos Filipe Nunes Barros, Maria Michele Araújo de Souza Cavalcante, Anna Monallysa Silva de Oliveira, Jefferson Halisson Lustosa da Silva, Felipe Pereira da Silva Barçante, Marlon de Araújo Castelo Branco, Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco, Jonathan Iago Costa Silva, obrigado pelas orientações, auxílio prestado durante a realização do projeto e pelos conhecimentos compartilhados.

Ao Proprietário dos cães utilizados, por tornar esse estudo possível.

Aos animais utilizados no experimento.

Muito obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT.....	x
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Características do Ejaculado e do Espermatozoide Canino	13
2.2 Colheita e Avaliação do Sêmen	14
2.3 Criopreservação	15
2.4 Espécies Reativas e Estresse Oxidativo	17
2.5 Antioxidantes	18
2.5.1 Vitamina E	20
2.6 Ácido Palmítico	20
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
CAPÍTULO 1.....	31
RESUMO.....	32
ABSTRACT.....	33
INTRODUÇÃO.....	34
MATERIAL E MÉTODOS	34
RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

Kg – Quilos

Sptz – Espermatozóides

mL – Mililitro

μ L – Microlitro

μ m – Micrômetro

G1 – Grupo um

G2 – Grupo dois

G3 – Grupo três

μ M – Micromolar

μ L – Microlitro

CASA - Computer-Assisted Sperm Analysis

TTR – Teste de Termo Resistência

MT – Motilidade Total

AGPIs – Ácidos Graxos Poli-insaturados

AGS – Ácidos Graxos Saturados

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I		Pag.
Tabela 1 -	Motilidade total (%) pós-descongelção de espermatozoides de cães, criopreservados em meio de congelação suplementado com ácido Palmítico e Vitamina E, avaliados pelo teste de termoresistência (TTR)	40
Tabela 2 -	Vigor (0-5) pós-descongelção de espermatozoides de cães, criopreservados em meio de congelação suplementado com ácido Palmítico e Vitamina E, avaliados pelo teste de termoresistência (TTR)	41
Tabela 3 -	Parâmetros cinéticos (CASA) pós-descongelção de espermatozoides de cães criopreservados com ácido palmítico e vitamina E	42
Tabela 4 -	Integridade da membrana plasmática (MP), Integridade acrossomal (AC), atividade mitocondrial (AM) pós-descongelção de espermatozoides de cães, criopreservados com ácido palmítico e vitamina E.	43

RESUMO

A criopreservação do sêmen é uma das principais biotécnicas aplicadas à reprodução animal, permitindo que ele seja armazenado, transportado e utilizado sempre que necessário. No entanto, esse procedimento reduz a fertilidade dos espermatozoides devido a lesões estruturais e funcionais advindas de estresse térmico, osmótico e oxidativo, decorrentes da redução de temperatura, armazenamento, descongelamento e toxicidade dos crioprotetores. Dessa forma, a adição de ácido palmítico e vitamina E aos meios diluidores de congelamento foi testada com a finalidade de preservar as estruturas espermáticas durante o processo de congelamento. Vinte (20) amostras de sêmen foram colhidas de quatro (4) cães da raça American Pitbull de sanidade conhecida, reprodutores, com idade entre 1 a 6 anos, pesando entre 15 a 25Kg por meio de manipulação digital, separando-se a fração espermática, e, posteriormente realizando-se as avaliações macroscópicas e microscópicas das mesmas. Cada amostra de sêmen coletada foi diluída em diluidor Tris-Gema na concentração de 100×10^6 Sptz/ml e dividida igualmente em alíquotas de 3ml para então formarem os três grupos experimentais adicionando-se os antioxidantes, sendo eles: G1) Tris-Gema (Grupo controle); G2) Tris-Gema + 100 μ M de ácido palmítico; G3) Tris-Gema + 116 μ M de vitamina E. As coletas de sêmen foram realizadas, semanalmente em um período de dois meses e sete dias. As amostras de sêmen foram congeladas em palhetas de 0,25ml e em um período mínimo de uma semana foram descongeladas para avaliação de alguns parâmetros, como, motilidade (MT) e vigor, integridade da membrana espermática, atividade mitocondrial e integridade do acrossomo, e análise da cinética espermática pelo Sistema de Análise Computadorizada do Sêmen (CASA) a fim de comparar os resultados entre os tratamentos. Para análise estatística dos dados, foram obtidas as médias e desvio-padrão, e procedida à análise de variância dos parâmetros avaliados. Para a comparação das médias foi realizado o teste de Duncan, de acordo com o coeficiente de variação obtido, considerando um nível de significância de 5%. Foi utilizado o PROC GLM (General Linear Models) do Software SAS (Statistical Analysis). Pelo teste de TTR, os antioxidantes em questão não apresentaram resultado significativo para os parâmetros de motilidade e vigor quando comparados ao controle. A vitamina E apresentou-se mais eficiente que o ácido Palmítico no parâmetro MT da análise CASA. Ácido Palmítico e Vitamina E não apresentaram efeitos significativos nos parâmetros de integridade acrossomal, atividade mitocondrial. Porém, espermatozoides criopreservados com Ácido Palmítico apresentaram resultados significativos para a integridade da membrana plasmática. Conclui-se que a suplementação do diluidor tris-gema com ácido palmítico na concentração 100 μ M, é capaz de preservar a integridade da membrana plasmática durante o processo de criopreservação do sêmen canino e a adição de 116 μ M de vitamina E não é suficiente para preservar as estruturas espermáticas.

Palavras-chave: Cão, Sêmen, Antioxidantes, Ácido palmítico, Vitamina E, Criopreservação.

ABSTRACT

Cryopreservation of semen is one of the main biotechnologies applied to animal reproduction, allowing it to be stored, transported and used whenever necessary. However, this procedure reduces sperm fertility due to structural and functional lesions due to thermal, osmotic and oxidative stress due to the reduction in temperature, storage, thawing and toxicity of the cryoprotectants. Thus, the addition of palmitic acid and vitamin E to the freezing dilution media was tested in order to preserve the sperm structures during the freezing process. Twenty (20) semen samples were collected from four (4) American Pitbull dogs of known sanity, breeders, aged 1 to 6 years, weighing between 15 and 25 kg by digital manipulation, separating the sperm fraction, and subsequently performing the macroscopic and microscopic evaluations of the same. Each collected semen sample was diluted in Tris-Gemma diluent at 100×10^6 Sptz/ml and divided equally into 3ml aliquots to form the three experimental groups, adding the following antioxidants: G1) Tris-Egg Yolk); G2) Tris-Egg Yolk + 100 μ M palmitic acid; G3) Tris-Egg Yolk + 116 μ M vitamin E. Semen collections were performed weekly in a period of two months and seven days. Semen samples were frozen in 0.25 ml vats and at least one week were thawed for evaluation of some parameters, such as motility (MT) and vigor, spermatic membrane integrity, mitochondrial activity and acrosome integrity, and analysis of sperm kinetics by the Computerized Semen Analysis System (CASA) in order to compare the results among the treatments. For the statistical analysis of the data, the means and standard deviation were obtained, and the analysis of variance of the evaluated parameters was performed. Duncan's test was used to compare the averages, according to the coefficient of variation obtained, considering a level of significance of 5%. PROC GLM (General Linear Models) of the SAS Software (Statistical Analysis) was used. By the TTR test, the antioxidants in question did not present significant results for the parameters of motility and vigor when compared to the control. Vitamin E was more efficient than the Palmitic acid in the MT parameter of the CASA analysis. Palmitic acid and Vitamin E did not present significant effects on the acrosomal integrity parameters, mitochondrial activity. However, spermatozoa cryopreserved with Palmitic Acid presented significant results for the integrity of the plasma membrane. It is concluded that the supplementation of the tris-egg yolk diluent with palmitic acid in the concentration 100 μ M, is able to preserve the integrity of the plasma membrane during the process of cryopreservation of canine semen, and the addition of 116 μ M of vitamin E is not enough to preserve the sperm structures.

Keywords: Dog, Semen, Antioxidants, palmitic acid, vitamin E, cryopreservation.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a inserção de animais domésticos no convívio social tem crescido de forma significativa. Além de animais de companhia, os cães desempenham diversas funções: modelo de tratamento para algumas doenças, guia para deficientes visuais, pastoreio de rebanhos, auxiliam na caça, atuam como guarda de bens e/ou pessoas e são utilizados para detecção de produtos ilícitos em atividades policiais e militares (BAPTISTA SOBRINHO *et al.*, 2009).

Com o aumento afetivo da relação entre cão e homem e a expansão do mercado pet, houve um crescimento do interesse por parte dos criadores em melhorar a eficiência reprodutiva de seus animais e preservar a genética e o fenótipo das diversas raças, levando dessa forma a uma maior utilização de biotécnicas da reprodução aplicadas aos cães como a criopreservação de sêmen e a inseminação artificial.

A criopreservação do sêmen é uma das principais biotécnicas aplicadas à reprodução animal, permitindo que ele seja armazenado, transportado e utilizado sempre que necessário (CBRA, 2013). Além disso, a congelação seminal diminui o trabalho e os gastos com transporte de animais e ainda diminui o estresse animal na mudança de ambiente, o que poderia interferir na eficiência reprodutiva.

No entanto, esse procedimento reduz a fertilidade dos espermatozoides devido a lesões estruturais e funcionais advindas de estresse térmico (MORTON; BRUCE, 1989; JASKO, 1994), osmótico e oxidativo (WATSON, 2000 ; BALL e VO, 2001), decorrentes da redução de temperatura, armazenamento, descongelação (MEDEIROS *et al.*, 2002) e toxicidade dos crioprotetores (WATSON, 2000; BALL e VO, 2001).

A escolha do diluidor deve apresentar boas qualidades relacionadas ao pH, osmolaridade, toxicidade e outras características que contribuam com a preservação dos gametas (NUNES; FERNÁNDEZ, 2001). O Tris permanece como o diluidor mais utilizado por diferentes grupos de pesquisa (BATISTA *et al.*, 2006; ROTA *et al.*, 2006). Os crioprotetores melhoram a sobrevivência espermática, mantendo a sua capacidade fertilizante após os processos de congelação-descongelação, apesar de reduzir o percentual de células móveis e viáveis (BAILEY *et al.*, 2000).

Diversos estudos têm demonstrado que o processo de criopreservação acarreta estresse oxidativo à célula espermática e que a adição de antioxidantes aos meios de refrigeração e congelação de sêmen ajuda a proteger o espermatozoide contra o dano induzido pelos radicais livres sobre a sua motilidade, viabilidade, produção de energia e integridade do DNA, bem como a interromper a reação em cadeia da peroxidação dos lipídios das membranas

espermáticas, em diversas espécies animais (MAIA, 2009; BICUDO, 2009). O estresse oxidativo é causado pela ação das espécies reativas de oxigênio (reactiveoxygenspecies- ROS), formas reduzidas de oxigênio e de seus produtos que são utilizados nos processos de modulação espermática para capacitação e fertilização, porém quando presentes sob a forma de radicais livres podem provocar danos estruturais a biomoléculas, DNA, lipídeos, carboidratos, proteínas, assim como a outros componentes celulares (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

O uso de antioxidantes para neutralizar os efeitos da ação das ROS pode melhorar a motilidade e a viabilidade dos espermatozoides criopreservados. Dessa forma, a adição dessas substâncias aos meios diluidores de congelamento tem sido testada com a finalidade de reduzir os danos celulares provocados pelo estresse oxidativo (MICHAEL *et al.*, 2007).

Em animais, o tratamento de amostras espermáticas com antioxidantes, como o α -tocoferol (Vitamina E) e outras enzimas antioxidantes têm sido estudadas com respostas variadas. Uma explicação para diferentes resultados seria a concentração utilizada dos antioxidantes; se estes não forem utilizados de forma criteriosa, testando diversas quantidades, o tratamento pode se tornar ineficaz (BAPTISTA SOBRINHO *et al.*, 2009).

O Ácido Palmítico, também tem sido reportado como substância de caráter antioxidativo. Scott e Dawson (1968), verificaram que o Ácido Palmítico e Mirístico dentro dos fosfolípidos podem ser oxidados para produção de energia. No entanto, ainda não existem evidências e estudos relativos a atividade antioxidante do Ácido Palmítico na criopreservação espermática de cães.

Na espécie canina, apesar dos avanços significativos nas biotecnologias reprodutivas, o sucesso da criopreservação de sêmen ainda varia significativamente entre os cães, dificultando o desenvolvimento de um protocolo específico e consistente

Dessa forma, esse estudo visa avaliar os efeitos da adição de ácido palmítico e da vitamina E ao diluidor Tris-Gema, na preservação estrutural espermática após o processo de criopreservação do sêmen canino.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características do Ejaculado e do Espermatozoide Canino

O sistema reprodutivo do cão é constituído por um escroto, dois testículos, dois epidídimos, dois cordões espermáticos, dois ductos deferentes, pênis, prepúcio e próstata (SILVA *et al.*, 2002; CARDOSO, 2002). Os testículos são constituídos de células intersticiais, as células de Leydig, que secretam hormônios masculinos; células germinativas, que se diferenciam por formar os espermatozoides e células de sustentação, ou de Sertoli, formando uma barreira que isola as células germinativas da circulação geral (NASCIMENTO; SANTOS, 2003).

As grandes variações observadas na espécie canina, quanto ao peso e ao volume entre as diferentes raças, fazem com que os ejaculados caninos apresentem oscilações significativas de volume e de concentração espermática (CUNHA, 1997).

Freiberg, em 1935, foi o primeiro a identificar o fracionamento do ejaculado de cães em três partes, propondo ainda que a colheita fosse fracionada (SOUZA, 1985).

A primeira fração, também chamada de pré-espermática, tem origem prostática, e destina-se à estabilização do pH e limpeza uretral, variando o volume entre algumas gotas até 2mL (SILVA *et al.*, 2002). A segunda fração, ou espermática, tem origem testicular, é rica em espermatozoides, com volume variando de 0,5mL a 5mL, conforme a variação individual e o tamanho testicular, possuindo um aspecto turvo, leitoso ou opalescente. A terceira fração é o fluido prostático, fácil de distinguir da fração espermática pelo seu aspecto cristalino, e com volume de até 30mL (SILVA *et al.*, 2002). Sua função é servir como um meio diluído natural, proporcionando o transporte dos espermatozoides no trato genital da cadela (CHRISTIANSEN, 1988; FELDMAN; NELSON, 1996).

Segundo Oettlé (1993), a primeira descrição do espermatozoide canino foi feita por Leeuwenhoek, em 1679, mas somente com o advento da microscopia, no século XIX, foi possível identificar as principais características morfológicas. A cabeça do espermatozoide é primariamente formada por DNA, que compõe o núcleo, sendo recoberta anteriormente pelo acrossoma e posteriormente pelo envoltório pós nuclear (BARLET, 1962). A conformação da membrana plasmática das células espermáticas segue com o modelo estrutural de uma bicamada de duplo folheto com fosfolipídios e proteínas associadas (WATSON, 1995). Nos espermatozoides, este duplo folheto não é simplesmente uma bicamada passiva de membrana lipídica em que receptores recebem seus sinais moleculares específicos, mas uma estrutura altamente especializada, que tem um papel ativo na capacidade fertilizante, recebendo sinais e

modificando-se ao longo do processo da espermatogênese, trânsito e armazenagem no epidídimo, ejaculação, depósito no trato genital feminino e, finalmente, na capacitação e penetração do oócito (CUNHA, 2002).

A membrana plasmática do espermatozoide na espécie canina apresenta uma baixa proporção de Ácidos graxos poliinsaturados, em relação aos Ácidos graxos saturados (BOUCHARD *et al.*, 1990). Essa particularidade provavelmente é responsável pelo espermatozoide canino apresentar uma resistência própria contra o choque térmico, uma vez que as células espermáticas do cão apresentam baixa sensibilidade às oscilações de temperatura (SILVA, 2005).

Na célula espermática, as mitocôndrias estão localizadas apenas na peça intermediária, formando a bainha mitocondrial e produzindo adenosina trifosfato para a célula através de respiração aeróbica. Embora essa função seja similar à de todas as células somáticas, a mitocôndria espermática tem sido associada a isoformas protéicas, não detectadas em mitocôndrias de células somáticas, como as de lactato desidrogenase e hexoquinase (TRAVIS *et al.*, 1998). A mitocôndria é responsável por, aproximadamente, 90% da produção de energia celular, a qual ocorre por meio do processo de fosforilação oxidativa (FO). Esta organela também é responsável pela maior parte da produção endógena de espécies reativas ao oxigênio (ROS) como biometabólitos, sendo considerada a reguladora central da apoptose celular (COPELAND, 2002).

2.2 Colheita e Avaliação do Sêmen

Sêmen é a suspensão celular líquida contendo espermatozoides (gametas masculinos) e secreções prostáticas. A porção fluida dessa suspensão, que é formada na ejaculação, é conhecida como plasma seminal (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Um exame andrológico completo em cães, incluindo histórico clínico e reprodutivo, exame físico, a colheita e avaliação do sêmen, além de recursos diagnósticos como a ultrassonografia de testículos, próstata e epidídimo (ENGLAND; PONZIO, 1996), é extremamente importante na avaliação da fertilidade (JOHNSTON, 1991).

A técnica de colheita do sêmen em cães é bastante simples, especialmente em cães condicionados. O sêmen é colhido por estimulação manual do pênis e prepúcio, com o animal em estação (FELDMAN; NELSON, 1996; SANTOS; VANNUCCHI, 1997). O ejaculado é colhido em frações, com auxílio de um funil de vidro ou de plástico, acoplado em tubo cônico graduado, pré-aquecido e protegido da luz (CHRISTIANSEN, 1988; MICHAEL *et al.*, 2008; BAPTISTA SOBRINHO *et al.*, 2009), devendo-se evitar contato direto entre o pênis e o

material da colheita, o qual deve ser mantido a aproximadamente 38°C (SEAGER; PLATZ, 1977).

A motilidade espermática é definida como a porcentagem de espermatozoides móveis da amostra avaliada imediatamente após a colheita ou após a criopreservação do sêmen com o auxílio da microscopia óptica (SEAGER; PLATZ, 1977). A avaliação da motilidade espermática é o parâmetro mais utilizado para a avaliação do sêmen após a colheita ou a criopreservação do sêmen (CARDOSO *et al.*, 2005). O sêmen de cães é avaliado imediatamente após a colheita pela motilidade progressiva retilínea, pelas alterações patológicas espermáticas, além da concentração espermática do ejaculado (SEAGER; PLATZ, 1977; MIALOT, 1988; SANTOS, 1997; BAPTISTA SOBRINHO *et al.*, 2009).

Em seguida, avalia-se o vigor espermático, que é a qualidade da motilidade exibida pelos espermatozoides móveis. Para tal, empregam-se escalas que variam de 0 a 5 (SEAGER; PLATZ, 1977; CHRISTIANSEN, 1988; SILVA, 2005).

Apesar da avaliação da motilidade espermática não ser empregada como uma mensuração dos espermatozoides vivos e mortos, ela fornece a informação de um fator que é necessário para a capacidade fertilizante do espermatozoide, pois é a manifestação da sua competência estrutural e funcional (PEÑA-MERTINEZ, 2004). Embora na espécie canina já tenham reportado que a motilidade está geralmente relacionada à integridade da membrana plasmática e à morfologia, a existência de correlações entre motilidade espermática e fertilidade *in vivo* ou *in vitro* permanece por ser mais bem esclarecida (SILVA, 2005). E, mesmo em outras espécies, essas relações entre motilidade e fertilidade ainda são bastante conflitantes.

2.3 Criopreservação e Diluidores

O congelamento de sêmen determina a sobrevivência espermática e a fertilidade e junto com a inseminação artificial pode contribuir para as trocas genéticas em grandes distâncias e ser utilizada ainda, associada à outras técnicas de reprodução assistida (CARVALHO *et al.*, 2004).

A criopreservação é uma biotécnica que permite o armazenamento de material genético por um tempo indefinido, porém causa uma diminuição na qualidade espermática após a descongelação (CARDOSO *et al.*, 2005).

Os protocolos atualmente disponíveis de criopreservação submetem as células espermáticas a situações de estresse, com comprometimento de sua viabilidade. Entre estas situações, destacam-se a exposição do espermatozoide a temperaturas não fisiológicas, o

estresse osmótico causado pelo elevado gradiente de concentração dos solutos no meio diluidor e a formação e dissolução de cristais de gelo no meio extracelular (WATSON, 2000).

A sobrevivência do espermatozoide criopreservado é afetada por vários fatores, como a composição do diluidor, a concentração empregada para o crioprotetor, o tipo de envase, a velocidade dos processamentos de congelação e reaquecimento e, principalmente, a qualidade do sêmen empregado (CARVALHO *et al.*, 2004).

Um bom diluidor deve conter nutrientes, servir como tampão ajustando as alterações do pH, proteger as células contra o choque térmico durante o processo de resfriamento, possuindo ainda ação crioprotetora, que reduza o dano à célula espermática durante o processo de congelação e posterior reaquecimento (CONCANNON; BATTISTA, 1989). O sêmen apropriadamente diluído pode ser congelado por tempo indeterminado, permanecendo potencialmente fecundante quando reaquecido e utilizado em uma inseminação artificial, desde que empregando um bom diluidor (SILVA, 2005).

A criopreservação do sêmen canino tem sido objeto de várias pesquisas na última década, com o objetivo de melhorar a qualidade do sêmen, que é diminuída após o reaquecimento (MICHAEL *et al.*, 2007). Com a finalidade de amenizar ou evitar os efeitos deletérios da criopreservação, alguns agentes crioprotetores são adicionados ao sêmen, promovendo alterações nas propriedades físicas da solução e estes agentes podem ou não atravessar a membrana plasmática, dependendo do seu peso molecular (BARROS, 2007).

Rodrigues *et al.* (1992) analisaram a ultraestrutura dos espermatozoides e a composição do sêmen congelado de cães, observando que as maiores mudanças ocorriam durante os processos de congelação e descongelação, sendo que a motilidade e a integridade do acrossomo diminuíram significativamente.

A avaliação da motilidade após a criopreservação tem como objetivo verificar a proporção de espermatozoides que mantiveram a motilidade após as injúrias causadas pelo processo de conservação (PEÑA, 2000).

Para o congelamento do sêmen canino, pouca ou nenhuma fração prostática deve ser colhida, devido ao efeito prejudicial dessa fração sobre a sobrevivência espermática e a criopreservação (CHRISTIANSEN, 1988; GABALDI; LOPES, 1998).

Os problemas relacionados à criopreservação de sêmen estão relacionados principalmente à conformação da membrana plasmática dos espermatozoides (VALENÇA; GUERRA, 2007). Segundo Bouchard *et al.* (1990), a membrana plasmática do espermatozoide canino apresenta uma baixa proporção de Ácidos graxos poliinsaturados em relação aos saturados. Essa particularidade seria o fator responsável pelo espermatozoide canino exibir uma resistência

própria contra o choque térmico, uma vez que as células espermáticas do cão apresentam baixa sensibilidade às oscilações de temperatura.

2.4 Espécies Reativas e Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é uma condição comum sofrida pelos sistemas biológicos em condições aeróbicas (GARRIDO *et al.*, 2004). O desequilíbrio entre as moléculas antioxidantes e as moléculas pró-oxidativas, também chamadas de espécies reativas do oxigênio, ou ROS, do inglês Reactive Oxygen Species, em um complexo biológico, é a definição para o estresse oxidativo (MICHAEL *et al.*, 2007).

ROS são encontrados em todos os sistemas biológicos (MAIA, 2006). Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, a molécula do oxigênio sofre uma reação tetravalente, aceitando quatro elétrons e resultando na formação de água. No decorrer desse processo, intermediários reativos são formados como os radicais superóxidos, hidroperoxila e hidroxila, além do peróxido de hidrogênio, que não é um radical. Normalmente a redução completa do oxigênio ocorre na mitocôndria e a reatividade das ROS é neutralizada pela entrada dos quatro elétrons (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

Entre as espécies reativas de oxigênio, as mais importantes são, radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$), ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o óxido nítrico (NO) (HALLIWELL; GUTERIDGE, 1989).

O radical hidroxila ($\text{OH}\cdot$) é a espécie reativa do oxigênio mais reativa e prejudicial, podendo ser formado através do peróxido de hidrogênio e do ânion superóxido, e por meio da reação do ânion superóxido com o óxido nítrico, produzindo o peroxinitrito (OONO^-), que se decompõe em NO_2 e OH^- (HALLIWELL, 1991).

Um dos principais fatores que levariam a danos de DNA espermático após o processo de criopreservação seria o ataque das ROS, que provocariam estresse oxidativo. Este tipo de estresse causa danos estruturais a biomoléculas, DNA, lipídeos, carboidratos e proteínas, assim como a outros componentes celulares (HALLIWELL, 1991). Trabalhos anteriores verificaram que o espermatozoide é particularmente susceptível ao ataque dos ROS (JONES; MANN, 1977). Tal fato deve-se à pequena quantidade de citoplasma na célula espermática normal, o que limita a quantidade de antioxidantes, principalmente os enzimáticos (VERNET *et al.*, 2004). Além disto, a grande quantidade de Ácidos graxos poli-insaturados (polyunsaturated fatty acids - PUFA) na membrana espermática, que permite a fluidez necessária para os eventos associados à fertilização (PARKS; HAMMERSTED, 1985; LENZI *et al.*, 2000; AGARWAL *et al.*, 2003), tornam os espermatozoides ainda mais vulneráveis.

As ROS apresentam um papel fundamental em diversos processos fisiológicos, sendo importante para a regulação da taxa de hiperativação, para a ocorrência da reação acrossômica e para a fusão espermatozoide/oócito (DE LAMIRANDE *et al.*, 1993; AITKEN, 1997; DE LAMIRANDE *et al.*, 1997; SENGOKU *et al.*, 1998).

ROS são encontrados em baixas concentrações, atuando como mediadores das funções espermáticas normais, entretanto, quando são produzidas em excesso, elas são altamente tóxicas às células espermáticas (MICHAEL *et al.*, 2007).

O mecanismo de ação das ROS na fisiologia normal do espermatozoide ainda não foi completamente elucidado, porém, resultados dos experimentos convergem para a definição de que os processos de hiperativação, capacitação, ligação com a zona pelúcida e reação acrossômica sejam processos oxidativos ou regulados por redução.

Apesar do efeito fisiologicamente normal das ROS na fisiologia espermática, um desbalanço entre a produção e a eliminação de ROS no sêmen acarreta efeitos prejudiciais ao espermatozoide. A excessiva produção de ROS, também chamada de estresse oxidativo positivo (EOP), é definida como a situação em que há uma mudança no balanço de ROS levando a um efeito pró-oxidativo, que ocorre tanto pelo excesso de ROS como pela diminuição de antioxidantes (DE LAMIRANDE *et al.*, 1997).

A produção de ROS leva a alterações estruturais do acrossomo, alterações metabólicas, perda irreversível da motilidade, prejuízo da capacidade respiratória, danos ao DNA espermático e redução do potencial fertilizante, pelo comprometimento da capacidade de ligação espermatozoide/oócito (BECONI *et al.*, 1993).

Uma vez que o estresse oxidativo corresponde a um desequilíbrio entre a produção de ROS e a proteção oxidativa no sêmen, torna-se concebível que a avaliação desse estresse através da mensuração dos níveis de ROS e/ou dos seus metabólitos, bem como dos níveis de antioxidantes presentes no sêmen seja feita (NICHI, 2003).

2.5 Antioxidantes

Antioxidantes são definidos como quaisquer substâncias que, quando presentes em baixas concentrações, quando comparadas com as de um substrato oxidável, retardam ou previnem significativamente a oxidação deste substrato (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

Os antioxidantes exercem um efeito protetor sobre a membrana plasmática de espermatozoides criopreservados, sendo capazes de manter a atividade metabólica e a viabilidade celular (BECONI *et al.*, 1993). Efeitos benéficos da suplementação de antioxidantes

tem sido descritos para sêmen de touros pós-descongelção (GADEA *et al.*, 2007), sêmen de cães (HATAMOTO *et al.*, 2006) e em humanos (AITKEN; CLARKSON, 1988).

Os antioxidantes exercem um efeito protetor sobre a membrana plasmática de espermatozoides criopreservados, sendo capazes de manter a atividade metabólica e a viabilidade celular (BECONI *et al.*, 1993).

É cada vez maior a procura de novos compostos com o objetivo de melhorar as defesas antioxidantes de sistemas biológicos bem como combater as espécies reativas de oxigênio, as responsáveis pelo estresse oxidativo, através do desequilíbrio do sistema redox em desvantagem para as substâncias antioxidantes do organismo (MOURÃO, 2007).

A produção de ROS durante o período de estocagem do sêmen é apontada como a principal causa da quebra estrutural da célula espermática, da redução de seus parâmetros andrológicos e no declínio do metabolismo energético da mesma (BAUMBER *et al.*, 2002).

Os antioxidantes combatem as ROS em três níveis: prevenção, interceptação e reparação, com objetivo único de proteger as células contra estresse oxidativo (AGARWAL *et al.*, 2008).

Estudos demonstram uma melhoria da qualidade dos espermatozoides com adição de substâncias antioxidantes, no meio diluente, utilizando-se diversas substâncias como: vitaminas E e C, Trolox, CAT, SOD, cisteamina, cisteína, selênio, etc (BUCAK *et al.* 2007).

As células espermáticas possuem um sistema de defesa antioxidante enzimático e um não enzimático. O sistema enzimático é composto pelas enzimas: SOD, CAT, peroxiredoxinas (Prx), glutatona (GSH), GR e GPx. E a defesa não enzimática, corresponde um grande número de compostos de baixo peso molecular, incluindo as 39 vitaminas C e E, diferentes compostos de selênio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico e ácido lipóico (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

As defesas antioxidantes endógenas têm como função remover as ROS ou convertê-las em produtos intermediários não tóxicos (REITER, 2009). Existem várias evidências da atividade protetora dos componentes do sistema antioxidante (FERREIRA e MATSUBARA, 1997), como o combate da LPO e da apoptose espermática, prevenção as lesões de reperfusão pós-isquemia de coração, rim, fígado e intestino, desempenhada por enzimas como, SOD e CAT (BARBOSA, 2010).

Com exceção da vitamina E (a-tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes encontra-se no meio intracelular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Acredita-se que esta vitamina é o inibidor primário de ROS encontradas em pequenas quantidades nas membranas celulares de mamíferos e no plasma seminal (SIKKA, 2004).

A identificação de antioxidantes que sejam capazes de minimizar os danos às células espermáticas durante a criopreservação, é um processo que deve ser bastante estudado ainda, isto porque há variações nas características do ejaculado nas diferentes espécies de acordo com as épocas do ano, além de sofrer influência da idade e da alimentação. (BRANCO, 2016).

2.5.1 Vitamina E

Vitamina E é um termo nutricional que se refere a um grupo de tocoferóis e tocotrienóis com atividade antioxidante. Somente oito moléculas naturais apresentam atividade antioxidante, sendo quatro tocoferóis (α , β , δ , γ) e quatro tocotrienóis (α , β , δ , γ) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

Um importante sistema de proteção aos danos oxidativos é a Vitamina E, ela é um componente lipofílico que não apenas destroem os radicais de oxigênio do interior da membrana assim como intercepta os radicais peroxil lipídicos que parecem ser importantes na propagação da reação em cadeia da peroxidação lipídica (ALMEIDA; BALL, 2005).

No processo de maturação, ocorre uma perda citoplasmática no espermatozoide, em consequência, os mecanismos endógenos de reparo, bem como as defesas enzimáticas, são prejudicados. O ataque pelas ROS ao espermatozoide pode ser evitado pelas enzimas e moléculas presentes no plasma seminal, como a Vitamina E (BARROS, 2007). O efeito protetor da Vitamina E para minimizar os efeitos deletérios do estresse oxidativo no sêmen pode ser explicado pela diminuição da lipoperoxidação da membrana (HATAMOTO *et al.*, 2006). Ao oxidar-se, a Vitamina E interrompe a reação em cadeia da peroxidação lipídica de biomembranas e lipoproteínas (BARROS, 2007).

Mediante as funções e os resultados comprovadamente benéficos da Vitamina E na suplementação alimentar, é despertado o interesse de adicionar tal composto ao diluente de criopreservação de espermatozoides.

A Vitamina E, também tem a vantagem de agir mesmo em concentração muito pequena (BUETTNER, 1993) e de ser um agente biológico modificador. A Vitamina E também forma complexos com os fosfolípidios da membrana, estabilizando-as através de ligações Van der Waals (BRADFORD *et al.*, 2003).

2.6 Ácido Palmítico

Os ácidos graxos são moléculas compostas de uma cadeia de hidrocarboneto e um grupamento carboxila, classificados como saturados e insaturados. São formados por fosfolípídeo, diglicerídeos e triglicerídeos sendo estes primeiros constituintes primários das

membranas biológicas (HAMES; HOOPER, 1997). Podendo também ser encontrados nas membranas espermáticas, os ácidos Palmítico e Esteárico (AITKEN; BAKER, 2006).

A composição de ácidos graxos dos espermatozoides tem se mostrado importante para a função espermática, uma vez que incorporados à membrana são importantes para a motilidade dos espermatozoides, a viabilidade espermática e o processo de fusão entre o espermatozoide e o oócito (LEWIS; MACCARRONE, 2009).

Em humanos os espermatozoides contêm alta quantidade de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), com níveis especialmente altos de ácido docosahexaenóico (DHA, C22: 6 n-3). Estudos mostram que os AGPIs ômega-3 nos espermatozoides e, especialmente, o ácido docosahexaenóico (DHA), modulam a concentração, morfologia e motilidade dos espermatozoides de forma positiva (MARTINEZ-SOTO *et al.*, 2013).

O epidídimo é o órgão responsável pelo processo de maturação e remodelação da membrana espermática. Durante a remodelação, ocorre a absorção de glicoproteínas epididimárias e consumo de fosfolípidos da bicamada de membrana, além da translocação de proteínas e componentes lipídicos (JONES, 1997), necessários para que o espermatozoide adquira mobilidade progressiva e capacidade de fertilizar um oócito (GATTI *et al.*, 2004).

Os ácidos graxos, em especial os fosfolípidos sofrem uma grande redução durante a fase epididimária, os espermatozoides bovinos chegam a perder metade dos seus principais fosfolípidos. Esta perda é necessária, uma vez que a retenção de ácidos graxos (saturados, monoinsaturados e poliinsaturados) indica a imaturidade e/ou defeito espermático (POULOS *et al.*, 1973). Ahluwalia e Holman (1969) estudando a estrutura espermática, observaram que a cauda do espermatozoide mantém mais ácidos graxos poliinsaturados do tipo n-3 do que a cabeça espermática, enquanto que a cabeça possuía uma maior concentração de ácidos graxos poliinsaturados tipo n-6 que as caudas.

O ácido palmítico e o ácido esteárico foram identificados como os ácidos graxos mais saturados presente no sêmen humano (KOPPERS *et al.*, 2010). Altos níveis de ácidos graxos poliinsaturados tipo n-6, foram encontrados em homens inférteis, apresentando uma relação positiva com a diminuição da concentração espermática, da motilidade e maior contagem de células patológicas (SAFARINEJAD *et al.*, 2010).

No plasma seminal os ácidos graxos docosahexaenóico (DHA), palmítico, oleico, linoleico, araquidônico, linolênico e esteárico (TAVILANI, 2006), conferem proteção aos espermatozoides contra choques térmicos e manutenção da motilidade espermática, desempenham importante papel na funcionalidade da célula, e conseqüentemente na capacidade de fertilização (GULAYA *et al.*, 2001).

Em cães, os lípidos totais no plasma seminal foram de 2,5 a 0,3%, correspondendo a 85% de ácidos gordos saturados (SFA) e 15% de ácidos gordos insaturados (UFA). As maiores proporções de AGS foram ácido palmítico (30,4%), ácido esteárico (23,4%) e ácido mirístico (5,3%) e ácido oléico (9,0%) (DÍAZ *et al.*, 2014).

Segundo Pérez-Pé *et al.* (2001) a adição de ácido oleico-linoléico teve um efeito benéfico na preservação da viabilidade de espermatozoides ovinos. Takahashi *et al.* (2012) relataram que a adição de ácido graxos exógenos melhorou a motilidade de espermatozoides congelados e descongelados e a viabilidade do sêmen de touro.

Estima-se que mudanças na quantidade e composição de lipídios na membrana plasmática dos espermatozoides durante a maturação explique a sensibilidade observada nos espermatozoides ejaculados.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, A.; COCUZZA, M.; ABDELRAZIK, H.; SHARMA, R. K. Oxidative stress measurement in patients with male or female factor infertility. In: POPOV, I.; LEWIN, G. (eds) **Handbook of Chemiluminescent Methods in Oxidative Stress Assessment. Transworld Research Network**, Trivandrum, Kerala, India, p.195-218, 2008.

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

AHLUWALIA, B.; HOLMAN, R. T. Fatty acid composition of lipids of bull, boar, rabbit and human semen. **J. Reprod. Fert.** V. 18, p. 431-437, 1969.

AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparations techniques. **Journal of Andrology**, v. 9, p. 367-376, 1988.

AITKEN, R. J.; IRVINE, D.S.; WU, F. C. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 164, p. 542-551, 1997.

ALMEIDA, J.; BALL, B. A. Effect of alfa-tocoferol e tocoferol succinato na peroxidação do espermatozóide de eqüinos. **Animal Reproduction Science**, v. 87, p. 321-337, 2005.

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

BALL, B. A.; VO, A. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectant on equine sperm motility, viability and mitochondrial membrane potential. **Journal of Andrology**, v.22, p.1061-1069, 2001.

BAPTISTA SOBRINHO, C. A.; HAKAMOTO-ZERVOUDAKIS, L. K.; BARNABE, V. H.; NICHI, M.; OLIVEIRA, C. A. Efeitos do estresse de trabalho sobre parâmetros seminais de cães da raça Rottweiler. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 46, n. 4, p. 280-287, 2009.

BARBOSA, K.B.; COSTA, N. M.; ALFENAS, R. C.; DE PAULA, S.O.; MINIM, V. P.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev Nutr**. v. 23, 2010.

BATISTA, M.; ALAMO, D.; GONZALEZ, F.; CRUZ, M. G.; GRACIA, A. Influence of the freezing technique (nitrogen liquid vs ultrafreezer of -152 degrees C) and male-to-male variation over the semen quality in Canarian Mastiff breed dogs. **Reprod Dom Anim**, v.41, p.423-428, 2006.

BARROS, P. M. H. **Estresse oxidativo e integridade do DNA em sêmen resfriado de gato-do-mato-pequeno (Leopardus tigrinus, SCHREBER, 1775)**. 2007. 130 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

BARTLETT, D. J. Studies on dog sêmen. I. Morphological characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 3, p. 173-189, 1962.

BAUMBER, J.; VO, A.; SABEUR, K.; BALL, B. A. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 57, p.1025-1033, 2002.

BECONI, M. T.; FRANZIA, C. R.; MORA, N. G.; AFFRANCHIO, M. A. effect of natural antioxidant on frozen bovine semen preservation. **Theriogenology**, v. 40, p. 841-851,1993.

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

BLOM, E. Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nord Vet Med**, v.25, p.383-391, 1973.

BRANCO, M. A. C. **Antioxidantes e inibidores de serino proteases sobre a viabilidade espermática do bovino curraleiro pé duro no processo de criopreservação**. 2016. 49 f. Tese (Doutorado) - Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, 2016.

BRADFORD, K. J. et al. Abscisic acid and gibberellin differentially regulate expression of genes of the SNF1-related kinase complex in tomato seeds. **Plant Physiol**. n. 132, v. 3, p. 1560-76, 2003.

BUETTNER, G. R. The pecking order of free-radicals and antioxidants: Lipid-peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 300, p. 535-543, 1993.

BUCAK, M. N.; ATEŞŞAHIN, A.; VARIŞLI, Ö.; YÜCE, A.; TEKIN, N.; AKÇAY, A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. **Theriogenology**, V. 67, p. 1060-1067, 2007

BOUCHARD, G. F., MORRIS, J. K., SIKES, J. D., YOUNGQUIST, R. S. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoa motility, **Theriogenology**, v. 34, p. 147-157, 1990.

CARDOSO, R. C. S.; SILVA, A. R.; SILVA, L. D. M. Métodos de avaliação do sêmen canino congelado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 29, n. 3/4, p. 179-187, 2005.

CARVALHO, S. F. M.; PEREIRA, M. T. C.; LIMA, T. B. F. Congelamento de sêmen e inseminação artificial em cães. Revisão. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**. n. 7, v. 1, p. 49-52, 2004.

CBKC – CONFEDERAÇÃO BRASILEIRA DE CINOFILIA, **Padrão oficial da raça Buldogue Francês (Buledogue Français)**. St FCI. Nº 101, 2015. 9p.

COLETO, Z.F. **Congelamento do sêmen da espécie canina adicionado de antioxidantes**. 2006. 84f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

CONCANNON, P. W.; BATTISTA, M. Canine semen freezing and artificial insemination. In: KIRK: **Current Veterinary Therapy: small animal practice**. 10. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1989. p. 1.247-1.259.

COPELAND WC. **Mitochondrial DNA: methods and protocols**. Totowa, NJ: Humana Press, 2002. 420p. (Methods in Molecular Biology, v.197)

CBRA – COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3.ed. Belo Horizonte, 2013, 104 p.

CHRISTIANSEN, I. J. **Reprodução no cão e no gato**. São Paulo: Manole, 1988.

COLETO, Z.F. Congelação do sêmen da espécie canina adicionando antioxidantes. 2006. 103p. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) -Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco.

CUNHA, I. C. N. **Estudo da viabilidade do processo de refrigeração do sêmen canino utilizando-se diluidores à base de leite e glicina-gema**. 1997. 124 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1997.

CUNHA, I.C.N. **Criopreservação do sêmen de cães**. 2002, 149 p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

DABROWSKI, K.; CIERESZKO, A. Ascorbic acid protects against male infertility in a teleost fish. **Experientia**. v.52, p.97- 100, 1996.

DAS, D. K.; MAULIK, N. Antioxidant effectiveness in ischemia-reperfusion tissue injury. **Methods Enzymol**. v. 233, p. 601-10, 1994.

DAWSON, E. B.; HARRIS, W.A.; RANKIN, W. E.; CHARPENTIER, L. A.; McGANITY, W. J. Effect of ascorbic acid on male fertility. **Ann N Y Acad Sci**. p. 312-23, 1987.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 14, p. 255-265, 1993.

DE LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v. 2, p. 48-54, 1997.

DÍAZ, R.; INOSTROZA, K.; RISOPATRON, J.; SANCHEZ, R.; SEPULVEDA, N. Identification of fatty acids in canine seminal plasma. **Andrologia**. p. 1-4, 2013.

EICHNER, E. R. Physical activity and free radicals. In: **BOUCHARD, C. (Ed), PHYSICAL ACTIVITY, FITNESS AND HEALTH**. Human Kinetics. Champaign: Illinois, 1994. p.35-42.

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

FELDMAN, E. D.; NELSON, R. C. Clinical and diagnostic evaluation of the male reproductive tract. In: __. **Canine and feline endocrinology and reproduction**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996. p. 673-690.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 43, n. 1, p. 1-16, 1997.

FRAGA, C. G.; MOTCHNIK, P. A.; SHIGENAGA, M. K. et al. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States**. v.88, p.11003-11006, 1992.

GABALDI, S. H.; LOPES, M. D. Considerações sobre a congelação de sêmen canino. **Clínica Veterinária**, Ano III, n. 14, p. 24-26, 1998.

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

GARRIDO, N.; MESEGUER, M.; SIMON, C.; PELLICER, A.; REMOHI, J. Pro-oxidative anti-oxidant imbalance in human sêmen ant its relation with male fertility. **Asian Journal of Andrology**, v. 6, p. 59-65, 2004.

GATTI, J.L.; CASTELLA, S.; DACHEUX, F.; ECROYD, H.; MÉTAYER, S.; THIMON, V. AND DACHEUX, J.L. Post-testicular sperm environment and fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 321-339, 2004.

GULAYA, N.M.; GOVSEVA, N. M.; GORPYNCHENKO, I. I.; MARGITICH, V.; KLIMASHEVSKY, V. M.; BOYKO, M. I. Phospholipid composition of human sperm and seminal plasma in relation to sperm fertility. **Archives of Andrology**. v. 46, n. 3, p. 169 – 75, 2001.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reproduction in farm animals**. 7th ed. Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins, 2004. 592 p.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine.3.ed. New York: Oxford University Press, 1999.

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Claredon Press, 1989. 543 p.

HAMES, B.; N. HOOPER. Instant notes in biochemistry. **Biochemical education**, v.25, p.253-254, 1997.

HATAMOTO, L. K.; BAPTISTA SOBRINHO, C. A.; NICHI, M.; BARNABE, V. H.; BARNABE, R. C.; CORTADA, C. N. M. Effects of dexamethasone treatment (to mimic stress) and vitamine E oral supplementation on the spermogram and n seminal plasma spontaneous

lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in dogs. **Theriogenology**, v. 66, p. 1610-1614, 2006.

JASKO, D. J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **Ars Veterinaria**. v.10, p.156-65, 1994.

JOHNSTON, S. D. Performing a complete canine semen evaluation in a small animal hospital. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v. 21, n. 9, p. 545-551, 1991.

JONES, R.; MANN, T. Damage to spermatozoa by peroxidation endogenous phospholipids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 50, p. 261-68, 1977.

KOPPERS, A. J., GARG, M. L., AND AITKEN, R. J. Stimulation of mitochondrial reactive oxygen species production by un-esterified, unsaturated fatty acids in defective human spermatozoa. **Free Radic. Biol. Med.** n. 48, v. 1, p. 112–119, 2010.

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

LEWIS, S. E.; MACCARRONE, M. Endocannabinoids, sperm biology and human fertility. **Pharmacological Research : The Official Journal of the Italian Pharmacological Society**. v.60, n.2, p.126–31, 2009.

MAIA, M. S.; BICUDO, S. D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.33, n.4, p. 183-193, 2009.

MAIA, M. S. **Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de lauril sulfato de sódio (OEP), trolox-C e catalase**. 2006. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade do Estado de São Paulo, Botucatu. 2006.

MARTÍNEZ-SOTO, J.; LANDERAS, J.; GADEA, J. Spermatozoa and seminal plasma 643 fatty acids as predictors of cryopreservation success. **Andrology**, v.1, p.365–375, 2013.

MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D.; RODRIGUES, J.L. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v.57, p.327-344, 2002.

MIALOT, J. P. **Patologia da reprodução dos carnívoros domésticos**. Porto Alegre: A Hora Veterinária, 1988. p. 61-67.

MICHAEL, A. J.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E. A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. J.; SARATSI, Ph.; VERVERIDIS, H.N.; BOSCO, C.M. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 68, p. 204-212, 2007.

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

- MILLAR, J. Vitamin C: the primate fertility factors. **Medical Hypotheses**. v.38, p.292–295, 1992.
- MORTON, D. B.; BRUCE, S. G. Semen evaluation, cryopreservation and factors relevant to the use of frozen semen in dogs. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.39, p.311- 16, 1989.
- MOURÃO, L. R. M. B. **Efeito antioxidante do ácido indol-3-acético sobre fígado de camundongos submetidos à hepatocarcinogênese induzida**. Dissertação de mestrado, Faculdade de zootecnia e engenharia de alimentos da Universidade de São Paulo, 2007.
- NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. 2. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 2003. 137 p.
- NICHI, M. **Sistemas de proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídeos seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de Dourados, MS**. 2003, 101 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- NORDEBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical in Biology & Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.
- NUNES, J. F.; FERNÁNDEZ, D. R. P. **Biotécnicas de la Reproduccion Caprina y Ovina**. Gráfica e Editora 2M Ltda, Fortaleza, 2001, 105p.
- OETTLÉ, E. E. Sperm morphology and fertility in the dog. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 47, p. 257-260, 1993.
- PARKS, J. E, HAMMERSTEDT, R. H. Development changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. **Biology of Reproduction**, v. 32, p. 653-668, 1985.
- PEÑA, A.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of Equex, one- of two-step dilution, and two freezing and thawing rates on post-thaw survival of dog spermatozoa. **Theriogenology**. v. 54, p. 859–875, 2000.
- PEÑA-MARTINEZ, I. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. **Anim. Reprod. Scien**. v. 82, p. 209-224, 2004.
- PÉREZ-PÉ, R., BARRIOS, B., MUIÑO-BLANCO, T., CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Seasonal differences in ram seminal plasma revealed by partition in an aqueous two-phase system. **J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl**. v. 760, p. 113–121, 2001.
- REITER R.J.; TAN, D. X.; MANCHESTER, L. C.; PAREDES, S. D.; MAYO, J. C.; SAINZ, R. M. 2009. Melatonin and reproduction revised. **Biology of Reproduction**, v.81, n.3, p.445-456, 2009.
- RODRIGUES, W. A. et al. Variabilidade para o teor de tanino em sorgo (*Sorghum bicolor* L.) e sua associação com a resistência a pássaros. **Ciência Prática**. v. 16, p. 74 – 77, 1992.
- ROTA, A.; MILANI, C.; CABIANCA, G.; MARTINI, M. Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. **Theriogenology**. v.65, p.1848-1858, 2006.

SANTOS, S. E. C.; VANNUCCHI, C. I. Inseminação artificial em cães. **Clínica Veterinária**, v. 2, n. 6, p. 22-24, 1997.

SCOTT, T. W.; DAWSON, R. M. C. Metabolismo f phospholipids by spermatozoa and seminal plasma. **Biochem. J.** v. 108, p. 457, 1968.

SEAGER, S. W. J.; PLATZ, C. C. Collection and evaluation of canine semen. **Veterinary Clinics of North America**, v. 7, p. 757-764, 1977.

SENGOKU, K.; TAMATE, K.; YOSHIDA, T.; TAKAOKA, Y.; MIYAMOTO, T.; ISHIKAWA, M. Effects of low concentrations of nitric oxide on the zona pellucida binding ability of human spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 69, n. 3, p. 522-527, 1998.

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

SILVA, A. R. **Criopreservação do sêmen canino diluído em Tris: Avaliação morfológica, funcional e de suas interações com oócitos homólogos**. 2005. 165 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) -Faculdade de Veterinária – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2005.

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

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**. v.35, n.4, p.370-384, 2011.

SONMEZ, M.; TURK, G.; YUCE, A. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats **Theriogenology** v.63 p. 2063–2072, 2005.

SOUZA, J. A. T. de **Estudo de algumas características do sêmen de cães da raça pastor alemão**. 1985. 80 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1985.

TAKAHASHI, H.; RIKIMARU, K.; KIYOHARA, R.; YAMAGUCHI, S. Effect of arachidonic acid-Enriched oil diet supplementation on the taste of broiler meat. **Asian-Australas J Anim Sci**. v. 25, p. 845–851, 2012.

TAVILANI, H.; DOOSTI, M.; ABDI, K.; VAISIRAYGANI, A.; JOSHAGHANI, H.R. Decreased polyunsaturated and increased saturated fatty acid concentration in spermatozoa from asthenozoospermic males as compared with normozoospermic males. **Andrologia**, v.38, p.173 – 178, 2006.

THIELE, J.J.; FREISLEBEN, H.J.; FUCHS, J. et al. Ascorbic acid and urate in human seminal plasma: determination and interrelationships with chemiluminescence in washed semen. **Human Reproduction**, s.L., v.10, p.110-155, 1995.

TRAVIS AJ, FOSTER JA, ROSENBAUM NA, VISCONTI PE, GERTON GL, KOPF GS, MOSS SB. **Targeting of a germ cell specific type I hexokinase lacking a porin-binding domain to the mitochondria as well as to the head and fibrous sheath of murine spermatozoa.** *Mol Biol Cell*, v.9, p.263-276, 1998.

VALENÇA, R. M. B.; GUERRA, M. M. P. Espécies reativas de oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal.** v. 31, n. 1, p. 47-53, 2007.

VANNUCCHI, C. I.; SATZINGER, S.; SANTOS, S. E. C. Avaliação seminal em cães - aspectos práticos. **Clínica Veterinária.** v. 3, n. 15, p. 22-7, 1998.

VERNET, P.; AITKEN, R. J; DREVET, J. R. Antioxidant strategies in the epididymis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 216, p. 31-39, 2004.

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

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

CAPÍTULO I*

1 Efeito da adição do ácido palmítico e da vitamina E ao diluidor Tris-gema na
2 criopreservação de sêmen canino

3
4 [*Effect of the addition of palmitic acid and vitamin E to the Tris-Egg Yolk extender on*
5 *canine semen cryopreservation*]

6
7 M. A. C. Sousa Filho^{1*}, J. A. T. Souza²

8
9 ¹Mestrando em Ciência Animal – CCA/UFPI – Teresina, PI

10 ²Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, CCA/UFPI

11 Campus da Socopo, 64049-550 – Teresina, PI

12 *e-mail: marcoscelestino90@gmail.com

13
14
15 **RESUMO**

16 Objetivou-se avaliar o efeito da adição do ácido palmítico e vitamina E na qualidade
17 seminal canina pós-descongelção. Cada amostra seminal coletada foi diluída em Tris-
18 Gema na concentração de 100×10^6 spz/ml e dividida em alíquotas de 3ml formando três
19 grupos experimentais: G1) Tris-Gema (Grupo controle); G2) Tris-Gema + $100 \mu\text{M}$ de
20 ácido palmítico; G3) Tris-Gema + $116 \mu\text{M}$ de vitamina E. Após a descongelção, realizou-
21 se o teste de termoresistência (TTR) em 0, 30, 60 e 90 minutos para avaliação de
22 motilidade e vigor, análise da integridade da membrana plasmática (MP) e acrossomal
23 (AC) e atividade mitocondrial (AM) usando sondas fluorescentes e análise da cinética
24 espermática por meio do CASA. No TTR, G2 e G3 não apresentaram resultados
25 significativos para a motilidade e vigor espermáticos quando comparados ao grupo
26 controle. Ácido palmítico e vitamina E também não tiveram efeitos significativos nos
27 parâmetros de AC e AM, porém espermatozoides criopreservados com ácido palmítico
28 apresentaram resultados significativos para a MP. Conclui-se que a suplementação do
29 diluidor tris-gema com ácido palmítico na concentração $100 \mu\text{M}$, é capaz de preservar a
30 integridade da membrana plasmática durante o processo de criopreservação do sêmen
31 canino e a adição de $116 \mu\text{M}$ de vitamina E não é suficiente para preservar as estruturas
32 espermáticas.

33 Palavras-chave: Cão, Sêmen, Antioxidantes, ácido palmítico, vitamina E.

34

35

36

37

ABSTRACT

The study objective was to evaluate the effect of the addition of palmitic acid and vitamin E on canine semen quality after thawing. Each collected seminal sample was diluted in Tris-egg yolk at 100×10^6 spz/ml and divided into 3ml aliquots forming three experimental groups: G1) Tris-egg yolk (control group); G2) Tris-egg yolk + $100 \mu\text{M}$ palmitic acid; G3) Tris-egg yolk + $116 \mu\text{M}$ vitamin E. After thawing, the thermoresistance test (TTR) was performed at 0, 30, 60 and 90 minutes for motility and vigor assessment, plasma membrane integrity analysis (MP) and acrosomal (AC) and mitochondrial (AM) activity using fluorescent probes and analysis of spermatic kinetics through CASA. In the TTR, G2 and G3 did not present significant results for sperm motility and vigor when compared to the control group. Palmitic acid and vitamin E also had no significant effects on AC and AM parameters, but spermatozoa cryopreserved with palmitic acid presented significant results for MP. It is concluded that the supplementation of the tris-egg yolk diluent with palmitic acid in the concentration $100 \mu\text{M}$, is able to preserve the MP during the cryopreservation process of canine semen and the addition of $116 \mu\text{M}$ of vitamin E is not enough to preserve the spermatozoa structures.

Keywords: Dog, Semen, Antioxidants, palmitic acid, vitamin E.

INTRODUÇÃO

71
72 Com o aumento afetivo da relação entre cão e homem e a expansão do mercado pet,
73 houve um crescimento do interesse por parte dos criadores em melhorar a eficiência
74 reprodutiva de seus animais e preservar a genética e o fenótipo das diversas raças, levando
75 dessa forma a uma maior utilização de biotécnicas da reprodução aplicadas aos cães como
76 a inseminação artificial (Makloski, 2012) e a criopreservação do sêmen (Madeira *et al.*,
77 2010), sendo esta última realizada por meio da refrigeração (Wittayarat *et al.*, 2012) e
78 da congelamento (Futino *et al.*, 2010).

79 O processo de criopreservação do sêmen foi uma das principais biotecnologias
80 aplicadas à reprodução animal, permitindo que ele seja armazenado, transportado e
81 utilizado sempre que necessário (CBRA, 2013). No entanto, esse processo pode ocasionar
82 danos espermáticos, reduzindo a fertilidade dos espermatozoides, como por exemplo,
83 redução da motilidade e vigor, aumento das alterações morfológicas, entre outros fatores
84 que implicam na redução da qualidade do sêmen preservado (Silva *et al.*, 2009).

85 Em animais, o tratamento de amostras espermáticas com antioxidantes, como o α -
86 tocoferol (vitamina E) e outras enzimas antioxidantes têm sido estudadas com respostas
87 variadas na preservação das funções espermáticas. Uma explicação para diferentes
88 resultados seria a concentração utilizada dos antioxidantes; se estes não forem utilizados
89 de forma criteriosa, testando diversas quantidades, o tratamento pode se tornar ineficaz
90 (Baptista Sobrinho *et al.*, 2009).

91 Os ácidos graxos têm sido associados positivamente com a regulação da função
92 espermática *in vitro*. Por exemplo, no sêmen bovino, os ácidos palmítico, esteárico e
93 oléico foram incorporados ao esperma *in vitro*, onde os ácidos graxos saturados foram
94 associados ao metabolismo energético e, portanto, à motilidade espermática (Ortega-
95 Ferrusola *et al.*, 2009). No entanto, ainda não existem evidências e estudos relativos a
96 atividade antioxidante do Ácido Palmítico na criopreservação espermática de cães.

97 Dessa forma, esse estudo visa avaliar os efeitos da adição de ácido palmítico e da
98 vitamina E ao diluidor Tris-Gema, na preservação estrutural espermática após o processo
99 de criopreservação do sêmen canino.

MATERIAL E MÉTODOS

Ética em Experimentação Animal

101 Todos os procedimentos realizados com os animais estavam em conformidade com
102 a legislação brasileira em pesquisa animal (Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008). O
103

104 procedimento descrito neste artigo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de
105 Animais (CEUA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI) sob o protocolo de N° 487/18.

106 **Local do Experimento**

107 As atividades de coleta de sangue e de sêmen, bem como a avaliação das
108 características físicas dos ejaculados (volume, aspecto, cor, vigor e motilidade
109 espermática) pré-congelação do sêmen, foram executadas nos cães de criadores, todos
110 localizados no município de Teresina, Piauí, no período de agosto a outubro de 2018.

111 A realização dos exames clínicos e laboratoriais de rotina (hemograma e bioquímica
112 sérica – ureia e creatinina) foram executados no Laboratório de Patologia Clínica do
113 Hospital Veterinário da Universidade Federal do Piauí (HVU/UFPI).

114 A concentração e a morfologia espermática, bem como a criopreservação, a
115 descongelação do sêmen e as análises seminais (características morfológicas, TTR e
116 sondas fluorescentes) pós-descongelação foram realizadas no LBRA/UFPI.

117 A morfometria e as análises computadorizadas do sêmen (CASA) foram realizadas
118 no Laboratório de Reprodução de Carnívoros da Universidade Estadual do Ceará
119 (LRC/UECE).

120 **Animais (Grupos Experimentais)**

121 Foram utilizados quatro (4) cães machos, adultos, aparentemente saudáveis,
122 reprodutores, com idade entre 1 a 6 anos, pesando entre 15 a 25Kg, da raça American Pit
123 Bull Terrier.

124 Antes de iniciar o experimento, os animais foram pesados, vermifugados e
125 submetidos a exame clínico geral, exame andrológico e exames de rotina (hemograma e
126 bioquímica sérica). Somente foram incluídos no estudo aqueles animais que apresentaram
127 os resultados dos exames dentro dos índices de normalidade para a espécie canina, bem
128 como apresentaram sorologia negativa para leptospirose e brucelose canina, e exame
129 parasitológico negativo para leishmaniose.

130 Também foram incluídos neste estudo cães que possuíam os órgãos do sistema
131 reprodutivo sem alterações detectáveis no exame físico, em condições de ejaculação,
132 com motilidade espermática igual ou superior a 70% e vigor espermático igual ou
133 superior a 3, conforme os critérios propostos pelo CBRA (2013).

134 Os ejaculados dos animais foram divididos em três grupos: no grupo I (GI) as
135 amostras seminais foram diluídas em Tris-gema, sem adição de antioxidantes (grupo
136 controle); no grupo II (GII) as amostras seminais foram diluídas em Tris-gema com

137 adição de 100 μ M de ácido Palmítico e o grupo III (GIII) as amostras seminais foram
138 diluídas em Tris-gema com adição de 116 μ M de Vitamina E. As coletas de sêmen foram
139 realizadas, semanalmente, em um período de pouco mais de dois meses.

140 Os animais foram submetidos ao mesmo manejo sanitário e nutricional durante todo
141 o experimento, mantidos em canis individuais tendo acesso a espaços abertos
142 diariamente. Foram alimentados com ração comercial de boa qualidade, oferecida duas
143 vezes ao dia e água *ad libitum*, durante todo o experimento.

144 **Coleta de Sêmen e Avaliação das Características Seminais**

145 O sêmen foi colhido pelo método da manipulação digital, com auxílio de um funil
146 encaixado em um tubo cônico graduado de 15ml. O sêmen foi colhido fracionado,
147 separando a fração prostática da fração rica em espermatozoides sendo esta fração
148 avaliada quanto ao volume, cor, aspecto, motilidade espermática total e vigor
149 espermático.

150 O volume do sêmen foi mensurado em mililitros (ml) no próprio tubo de coleta
151 (tubo cônico tipo falcon de 15 ml). Em seguida, uma alíquota do sêmen (10 μ l) foi
152 colocada entre lâmina e lamínula, pré-aquecidas a 37°C em placa aquecedora, e sob
153 microscopia de luz convencional (40X), foi avaliada a motilidade total (MT), expressa
154 em porcentagem e o vigor espermático, em escala de 0 a 5, onde 0 representa ausência de
155 movimento e 5 o vigor máximo.

156 **Antioxidantes**

157 A Vitamina E foi obtida em farmácia de manipulação, na apresentação em pó, pura,
158 para assim ser homogeneizada em água destilada para uma concentração de 100mg/ml,
159 após diluída, foi adicionado 116 μ M da vitamina diretamente ao sêmen diluído em Tris-
160 Gema.

161 O Ácido Palmítico foi obtido por meio da empresa Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO,
162 USA), previamente diluído e em apresentação líquida, pronto para ser adicionado ao
163 sêmen diluído em Tris-Gema, na concentração desejada.

164 **Diluição Seminal com Antioxidantes**

165 Após a coleta de sêmen dos animais, cada ejaculado foi diluído em Tris-Gema
166 (3,028g Tris hidroximetil aminometano; 1,78g ácido cítrico monohidratado; 1,25g D-
167 frutose/ Dinâmica® Química Contemporânea Ltda; 100 ml de água destilada; 20% de
168 gema de ovo; 6% de glicerol, pH 7,0 e osmolaridade 316 mOsm/L) na concentração de
169 100x10⁶ espermatozoides por ml, e dividido igualmente em três alíquotas de 3ml. Após a

170 diluição em Tris-Gema e divisão em três alíquotas, foram formados os três grupos
171 experimentais supracitados e as amostras seminais foram acondicionadas em banho maria
172 a 37°C e reavaliadas a fim de observar mudanças na qualidade seminal pós diluição.

173 **Criopreservação do Sêmen**

174 Imediatamente após a coleta e processamento, as amostras de sêmen dos três
175 tratamentos foram acondicionadas em recipientes previamente identificados e
176 depositadas em isopor de 5 litros com placas de gelo reutilizáveis a 15°C por 40 minutos
177 (Taxa de refrigeração: -0,40°C/min), e então transferidas para um refrigerador por mais
178 30 minutos, até alcançar 5°C (Taxa de refrigeração: -0,20°C min).

179 Ao atingir a temperatura de 5°C, foram esperados mais trinta minutos para
180 estabilização. Após esse período, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,25 mL,
181 previamente identificadas, transferidas para uma caixa de isopor, posicionadas
182 horizontalmente 5 cm acima do nível do nitrogênio líquido, por 5 minutos, até alcançar
183 uma temperatura média de -70°C. Finalmente, as palhetas foram imersas em nitrogênio
184 líquido e armazenadas em botijão criogênico a -196°C em racks identificadas conforme
185 metodologia de Silva *et al.*, (2006).

186 A descongelação das amostras foi realizada um mês após a congelação por imersão
187 das palhetas em banho-maria a temperatura de 37°C durante um minuto (Silva *et al.*,
188 2006). Após a descongelação, realizaram-se as avaliações seminais quanto à motilidade
189 total e vigor espermático com o teste de termoresistência (TTR), a avaliação da cinética
190 espermática pela análise computadorizada (CASA) e as avaliações da integridade da
191 membrana plasmática e acrossomal, e atividade mitocondrial por meio de sondas
192 fluorescentes.

193 **Teste de Termoresistência (TTR)**

194 O Teste de Termoresistência (TTR) foi realizado colocando as amostras de sêmen
195 descongeladas em micro tubos de 1,5mL e incubando-as a 37°C em banho-maria.
196 Posteriormente, as amostras foram avaliadas quanto à motilidade total (MT - %) e o vigor
197 espermático sob microscopia de contraste de fase (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio,
198 Japão) com placa aquecedora acoplada, nos tempos de 0, 30, 60 e 90 minutos, em aumento
199 de 400x.

200 **Avaliação da Cinética Espermática**

201 A cinemática espermática foi avaliada por meio de um Sistema de Análises
202 Computadorizada do sêmen (CASA). Após a descongelação do material seminal, uma

203 alíquota de 10 μ L foi colocada em câmara de Markler aquecida a 37°C e avaliada em
204 microscópio de contraste de fase (Nikon TM H5505, Eclipse 50i, Japão), acoplado a uma
205 câmara de vídeo (Brasler Visão Tecnologie TM A312FC, Ahrensburg, Alemanha), ambos
206 adaptados ao *Software Sperm Class Analyser* (SCA, Microptics, S.L., versão 3.2.0,
207 Barcelona, Espanha). As variáveis avaliadas foram: motilidade total (MT - %), motilidade
208 progressiva (MP - %), velocidade curvilínea (VCL - μ m/s), velocidade em linha reta
209 (VSL - μ m/s), velocidade média do percurso (VAP- μ m/s), linearidade (LIN - %),
210 retilinearidade (STR-%), índice de oscilação ou wobble (WOB - %), amplitude (ALH -
211 μ m) e frequência de batimento flagelar cruzado (BCF - Hz), para cada espermatozoide
212 analisado.

213 **Análise das Estruturas Espermáticas**

214 Para avaliação da integridade da membrana plasmática utilizou-se o método de
215 coloração dupla com diacetato de carboxifluoresceína (DCF; Sigma-Aldrich®, St. Louis,
216 MO, USA) e iodeto de propídio (IP; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA), modificado
217 por Coletto et al. (2006), em que alíquotas de 50 μ L de sêmen pós descongeladas foram
218 diluídas em 150 μ L de Tris (3,605 g de Tris, 2,024 g de ácido cítrico, 1,488g de frutose,
219 100 ml de água destilada) contendo 5 μ L de DCF (0,46mg/ml em DMSO) e 20 μ L de IP
220 (0,5mg/ml em PBS) e incubadas por 10 minutos a 37°C. Um total de 200 espermatozoides
221 foram avaliados em microscópio de epifluorescência (Olympus optical Co., Ltda.,
222 Tóquio, Japão), com aumento de 400x, usando-se filtro de emissão DBP 580- 630nm e
223 excitação DBP 485/20nm. Os espermatozoides foram classificados em membrana intacta
224 quando se apresentavam corados em verde e com membrana danificada quando corados
225 em vermelho.

226 Para avaliação da integridade do acrossoma, utilizou-se o corante isotiocianato de
227 fluoresceína conjugado a Peanut agglutinin (FITC-PNA; Sigma-Aldrich®, St Louis, MO,
228 USA), segundo a técnica descrita por Roth et al. (1998), uma alíquota de 20 μ L da solução
229 estoque de FITC-PNA (1mg/ml) foi descongelada e adicionada à 480 μ L de solução de
230 fosfato tamponada (PBS) para obter a concentração final de 100 μ g/ml. Alíquotas (20 μ L)
231 desta solução foram colocadas sobre esfregaços de lâminas contendo espermatozoides, as
232 quais foram incubadas por 20 minutos em câmara úmida a 4°C, na ausência de luz. Após
233 incubação, as lâminas foram enxaguadas duas vezes em PBS refrigerado (4°C) e
234 colocadas para secagem na ausência de luz. Imediatamente antes da avaliação, 5 μ L de
235 meio de montagem UCD (4,5mL de glicerol, 0,5mL de PBS, 5mg de azida sódica e 5mg

236 de p-fenilenodiamina) foram colocados sobre a lâmina e cobertos com lamínula. Foram
237 avaliados 200 espermatozoides por lâmina, com aumento de 1000x, sob óleo de imersão,
238 em microscópio de epifluorescência (Olympus optical Co., Ltda., Tóquio, Japão), usando-
239 se filtro de emissão LP 515nm e BP 450-490nm para excitação. Os espermatozoides
240 foram classificados como portadores de acrossomas intactos, quando apresentavam a
241 região acrossomal corada com fluorescência verde, ou com acrossoma reagido, quando
242 apresentavam uma faixa verde fluorescente na região equatorial da cabeça espermática
243 ou não apresentavam fluorescência verde em toda região da cabeça.

244 A atividade mitocondrial foi determinada pela utilização de um fluorocromo
245 catiônico lipofílico JC-1 (Guthrie e Welch, 2006). Para tanto, alíquotas de 50µL de sêmen
246 pós-descongelado foram diluídas em 150µL de Tris contendo 5µL de JC-1 (0,15mM em
247 DMSO) e incubadas por 10 minutos a 37°C. Um total de 200 espermatozoides foram
248 avaliados em microscópio de epifluorescência (Olympus optical Co. Ltda., Tóquio,
249 Japão), com aumento de 1000x, sob óleo de imersão, usando-se filtro de emissão LP
250 515nm e BP 450-490nm para excitação. As células que apresentaram a região da peça
251 intermediária fortemente coradas em laranja foram classificadas com alto potencial de
252 membrana mitocondrial, enquanto aquelas que apresentaram a região de peça
253 intermediária não coradas ou fracamente coradas em laranja, foram classificadas com
254 baixo potencial mitocondrial.

255 **Análise Estatística**

256 Para análise estatística dos dados, foram obtidas as médias e desvio-padrão, e
257 procedida à análise de variância dos parâmetros avaliados. Para a comparação das médias
258 foi realizado o teste de Duncan, de acordo com o coeficiente de variação obtido,
259 considerando um nível de significância de 5%. Foi utilizado o PROC GLM (General
260 Linear Models) do Software SAS (Statistical Analysis).

261 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

262 Os dados apresentados na Tab. 1, mostraram que a adição de ácido palmítico e
263 vitamina E ao diluidor seminal não interferiram significativamente ($P>0,05$) na
264 motilidade espermática durante a avaliação do TTR quando se comparam as médias da
265 soma das motilidades de cada tratamento dentro dos tempos observados.

266 Esses resultados corroboram com os resultados obtidos por Chacur *et al.* (2017),
267 onde a adição de 200mM de vitamina E em meio Tris-gema não influenciou

268 significativamente para os resultados de motilidade e vigor após a descongelação do
269 sêmen canino.

270 Bem como os resultados observados por Castelo Branco, (2018) são semelhantes
271 os observados no presente projeto, onde no teste de termoresistência (TTR) espermática
272 a 37°C nos tempos de 0, 60, 120 e 180 minutos, observou-se que para os parâmetros de
273 motilidade e vigor não houve diferença estatística entre os tratamentos e o controle
274 quando adicionados diferentes concentração de ácido palmítico (50µM e 100µM) ao
275 diluidor de criopreservação de sêmen bovino (P>0,05).

276 **Tabela 1.** Motilidade total (%) pós-descongelação de espermatozoides de cães, criopreservados em meio de congelção suplementado
277 com ácido Palmítico e Vitamina E, avaliados pelo teste de termoresistência (TTR)

Parâmetros	Tempo (min)	Controle	Ácido Palmítico	Vit. E	Média (Tempo)
Motilidade (%)	0	22.50 ± 11.18	29.00 ± 13.33	23.40 ± 11.90	24.96 ^A
Motilidade (%)	30	7.05 ± 7.27	9.30 ± 9.44	7.05 ± 9.19	7.80 ^B
Motilidade (%)	60	2.75 ± 5.95	3.00 ± 4.70	1.00 ± 3.07	2.25 ^C
Motilidade (%)	90	0.50 ± 2.23	1.00 ± 3.07	0.00 ± 0.00	0.50 ^C
Motilidade (%)	Média	8.20^a	10.57^a	7.86^a	—

278 Os valores são expressos como média ± desvio padrão (DP)

279 Médias de motilidade com letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si pelo teste de Student Newman Keuls a 5% (P>0,05).

280 Médias com letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os valores obtidos pelos parâmetros
281 avaliados (P ≤0,05), pelo teste de Student Newman Keuls.

282

283

284

285

286

287

288

289

290

291

292

293

294

295

296

297

298

Já o vigor é uma característica que descreve a qualidade da motilidade espermática (Silva *et al.*, 2009), é possível observar na Tab.2 que a adição de ácido palmítico e vitamina E ao diluidor seminal não influenciou no vigor espermático pós-descongelção, conseqüentemente não houve diferença significativa ente os antioxidantes e o grupo controle (p>0,05).

A média do vigor espermático no tempo zero (0) para todos os tratamentos foi 2,84 pontos, resultado semelhante foi observado por Moura et al. (2002), no qual obteve 2,77 pontos para vigor após uma semana da congelção de sêmen canino utilizando Tris-gema como diluente, sem adição de antioxidantes. Coletto (2006) constatou em seu experimento que a adição de 200µM do análogo da vitamina E (Trolox) ao diluidor Tris-gema não foi suficiente para interferir significativamente nos valores do vigor espermático do sêmen canino descongelado, pelo teste de TTR.

Comparando-se os grupos G2 e G3, o primeiro destacou-se nos resultados finais para vigor no teste TTR demonstrando ser mais eficiente que a vitamina E. Tal fato está relacionado com o aspecto do diluidor após a adição dos antioxidantes, onde a adição de

299 ácido palmítico proporcionou um diluidor mais homogêneo e fluido, diferente da adição
 300 de vitamina E que proporcionou um ambiente mais viscoso e com presença de grumos,
 301 prejudicando a movimentação dos espermatozoides.

302 **Tabela 2.** Vigor (0-5) pós-descongelação de espermatozoides de cães, criopreservados em meio de congelamento suplementado com
 303 ácido Palmítico e Vitamina E, avaliados pelo teste de termoresistência (TTR)

Parâmetro	Tempo (min)	Controle	Ácido Palmítico	Vit. E	Média (Tempo)
Vigor (1-5)	0	2.82 ± 0.37	2.85 ± 0.72	2.85 ± 0.36	2.84^A
Vigor (1-5)	30	1.60 ± 1.39	1.72 ± 1.35	1.20 ± 1.28	1.50^B
Vigor (1-5)	60	0.45 ± 0.99	0.70 ± 1.17	0.15 ± 0.48	0.43^C
Vigor (1-5)	90	0.15 ± 0.67	0.30 ± 0.92	0.00 ± 0.00	0.15^C
Vigor (1-5)	Méd.	1.25^{ab}	1.39^a	1.05^b	—

304 Os valores são expressos como média ± desvio padrão (DP)

305 Médias de vigor com letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Student Newman Keuls a 5% ($P \leq 0,05$).

306 Médias com letras maiúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os valores obtidos pelos parâmetros
 307 avaliados ($P \leq 0,05$), pelo teste de Student Newman Keuls.

308

309 Como é mostrado nas Tab. 1 e 2, a motilidade e vigor espermáticos variaram de
 310 acordo com os tempos de termoresistência ($P \leq 0,05$), ou seja, a medida que os tempos de
 311 observação dos parâmetros vai passando, ocorre uma redução nos valores de motilidade
 312 e vigor. Esse fator pode ocorrer devido a um maior consumo de suas substâncias nutritivas
 313 nos primeiros períodos do teste, além das perdas de componentes intracelulares ou de
 314 lesões estruturais na cauda dos espermatozoides, diminuindo sua viabilidade em função
 315 da redução do ATP produzido durante as duas primeiras horas (Barros *et al.*, 2013). Vale
 316 ressaltar que não houve interação significativa dentro da análise experimental entre o fator
 317 tempo e os tratamentos.

318 Conforme a Tab.3, na qual avalia os parâmetros cinéticos pós-descongelação nos
 319 diferentes grupos, pode-se inferir que a adição de ácido palmítico e vitamina E ao diluidor
 320 seminal não interferiu significativamente ($P > 0,05$) nos valores dos parâmetros
 321 observados, em relação ao grupo controle.

322 Na avaliação dos parâmetros cinéticos do sêmen descongelado, é importante frisar
 323 que apesar de não apresentarem diferenças significativas para o grupo controle, os grupos
 324 G2 e G3 apresentaram diferenças significativas entre si ($P \leq 0,05$) quando se comparam as
 325 médias para os valores de MT e MP, deixando claro que a vitamina E foi mais eficiente
 326 que o ácido palmítico na manutenção desses parâmetros. Apesar de apresentar um
 327 resultado mais expressivo em relação ao ácido palmítico, a utilização da vitamina E neste

328 trabalho foi similar aos resultados obtidos por Peixoto *et al.* (2013), onde a adição do
 329 análogo hidrossolúvel da vitamina E (200µM Trolox), não melhorou a motilidade
 330 progressiva e o vigor espermático em cães, em relação ao grupo controle (sem adição de
 331 antioxidantes).

332 Apesar de ainda não existirem relatos do uso do ácido palmítico como antioxidante
 333 no processo de criopreservação de sêmen canino, estudos como de (Kiernan, 2013;
 334 Castelo Branco, 2018) relataram o efeito antioxidante desse ácido adicionado aos
 335 diluidores de sêmen de touros. Enquanto que, em trabalhos como de Kiernan *et al.* (2013)
 336 relataram que a adição de (100µM) de ácido palmítico em diluidores a base de citrato,
 337 com e sem gema de ovo, melhorou a motilidade progressiva, motilidade linear e a
 338 viabilidade de espermatozoides de touros refrigerados por sete dias, mostrando-se
 339 contrário aos resultados obtidos no presente estudo.

340 Os resultados mostram que não houve diferença estatística ($P>0,05$) entre o grupo
 341 controle e os tratamentos estudados para as variáveis VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB,
 342 ALH e BCF.

343 **Tabela 3.** Parâmetros cinéticos (CASA) pós-descongelamento de espermatozoides de cães criopreservados com ácido palmítico e
 344 vitamina E

Parâmetros de Motilidade	Controle	Ácido Palmítico	Vitamina E
MT	22.47 ± 10.79 ^{ab}	21.08 ± 7.72 ^b	27.05 ± 10.39 ^a
MP	8,36 ± 3.91 ^{ab}	7.64 ± 3.82 ^b	9.82 ± 4.45 ^a
VCL	60.80 ± 8.96	62.56 ± 9.10	63.17 ± 8.19
VSL	40.38 ± 10.59	39.69 ± 10.70	39.90 ± 9.33
VAP	45.82 ± 9.94	46.19 ± 9.03	45.72 ± 9.40
LIN	65.59 ± 8.57	62.49 ± 10.74	64.39 ± 5.30
STR	87.38 ± 4.39	86.75 ± 4.99	86.70 ± 3.86
WOB	74.82 ± 6.58	73.44 ± 6.55	74.18 ± 3.90
ALH	2.52 ± 0.50	2.75 ± 0.60	2.81 ± 0.45
BCF	11.68 ± 2.28	12.30 ± 2.97	12.60 ± 1.46

345 Os valores são expressos como média ± desvio padrão (DP)
 346 Valores de média com letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P \leq 0,05$)
 347 pelo teste de Duncan.
 348

349 A adição dos antioxidantes ao diluidor seminal Tris-gema não demonstrou
 350 influenciar significativamente ($P>0,05$) na porcentagem de células com membranas
 351 acrossomais intactas e peças intermediárias ativas, como mostra a Tab. 4.

352 Ao se comparar a porcentagem de células com membrana plasmática íntegra,
 353 observou-se que o grupo ácido palmítico se sobressaiu diante dos grupos controle e
 354 vitamina E, apresentando média com diferença significativa ($p \leq 0,05$) por meio da análise
 355 das sondas.

356 **Tabela 4.** Integridade da membrana plasmática (MP), Integridade acrossomal (AC), atividade mitocondrial (AM) pós-descongelamento
 357 de espermatozoides de cães, criopreservados com ácido palmítico e vitamina E.

Parâmetros	Controle	Ácido Palmítico	Vitamina E
MP íntegra	28.40 ± 8,87 ^{bc}	45.60 ± 11.13 ^a	39.80 ± 14.00 ^b
AC íntegro	41.00 ± 22.14	42.80 ± 22.52	42.05 ± 23.50
AM	26.30 ± 16.52	30.70 ± 17.70	27.10 ± 19.29

358 Os valores são expressos como média ± desvio padrão (DP)

359 Valores de média com letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas entre os valores obtidos pelos
 360 parâmetros avaliados ($P \leq 0,05$), pelo teste de Duncan.

361 Nesse sentido, os resultados apresentados nas Tab. 1, 2 e 3 evidenciaram que a
 362 adição de antioxidantes nas concentrações utilizadas, não foram eficientes em equilibrar
 363 o nível de peroxidação lipídica das membranas espermáticas, e conseqüentemente, não
 364 promoveram a manutenção de bons parâmetros para motilidade e vigor destas células,
 365 uma vez que os grupos G2 e G3 obtiveram percentuais semelhantes ao grupo controle,
 366 sem diferenças significativas ($P \leq 0,05$).

367 Além disso, para a biotécnica da congelação de sêmen, a concentração de vitamina
 368 E utilizada no diluente não diminuiu os danos causados pelo choque térmico durante o
 369 processo, conforme teoria publicada por Watson (1995), contrariando a hipótese de que
 370 a adição da vitamina E aos meios diluentes iria minimizar os efeitos negativos da elevada
 371 produção de ROS durante o processo de congelação do sêmen (Agarwal *et al.*, 2003).

372 Sabe-se que presença de ácidos graxos insaturados proporciona maior fluidez à
 373 membrana e é importante para o desenvolvimento da motilidade (Aboagla e Terada,
 374 2003). Apesar de serem cruciais para o bom funcionamento da membrana plasmática, a
 375 presença de ligações duplas, típicas de insaturação, aumenta a reatividade química e pode
 376 favorecer a ação dos radicais livres e da peroxidação lipídica resultando em danos à
 377 membrana e perda de motilidade.

378 Ácidos graxos saturados (SFAs) são assim considerados por não possuírem ligações
 379 duplas em sua cadeia de hidrocarbonetos. Os SFAs mais comuns nos espermatozoides
 380 são ácido palmítico (16: 0) e ácido esteárico (18: 0) (Aitken e Baker, 2006). Devido à
 381 ausência de ligações duplas e triplas, os ácidos graxos saturados são mais compactados

382 nas membranas celulares e, portanto, reduzem a fluidez da membrana. A fluidez da
383 membrana aumenta à medida que os níveis de insaturação da membrana aumentam.

384 Em estudos realizados por Díaz et al. (2013) na análise do plasma seminal canino,
385 observou-se que os lipídios totais no plasma seminal foram de 2,5 a 0,3%,
386 correspondendo a 85% de ácidos graxos saturados e 15% de ácidos graxos insaturados.
387 As maiores proporções de ácidos graxos saturados foram ácido palmítico (30,4%), ácido
388 esteárico (23,4%) e ácido mirístico (5,3%) e ácido oléico (9,0%). Tem-se conhecimento
389 de que ácidos graxos saturados são mais ativamente incorporados aos lipídios dos
390 espermatozoides de bovinos, e que na composição do plasma seminal o ácido palmítico
391 compreende apenas 13,2%, sendo ele o de menor proporção (Neill e Masters, 1972).

392 Levando isso em consideração, a concentração de 100µM ocasionou os baixos
393 valores para os parâmetros de motilidade e vigor nas Tab. 1, 2 e 3, causando uma
394 descompensação no nível de ácidos graxos saturados, tornando a membrana menos fluida,
395 menos suscetível à peroxidação lipídica e conseqüentemente menos ativa, o que manteve
396 a integridade da membrana na Tab. 4.

397 **CONCLUSÕES**

398 Conclui-se que a suplementação com o antioxidante ácido palmítico na
399 concentração 100µM, é capaz de preservar a integridade da membrana plasmática durante
400 o processo de criopreservação do sêmen canino e a adição de 116µM de vitamina E não
401 é suficiente para preservar as estruturas espermáticas.

402 **REFERÊNCIAS**

- 403 ABOAGLA, M. E., & TERADA, T. (2003). Trehalose-enhanced fluidity of the goat
404 sperm membrane and its protection during freezing. *Biology of Reproduction*, 69, 1245–
405 1250.
- 406 AGARWAL A., RAMADAN A. & MOHAMED A.B. 2003. Role of reactive oxygen
407 species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility*. 79(4): 829-
408 843.
- 409 AITKEN, R. J. AND M. A. BAKER, 2006: Oxidative stress, sperm survival and fertility
410 control. *Molecular and cellular endocrinology*, 250, 66–69.
- 411 BAPTISTA SOBRINHO, C. A.; HAKAMOTO-ZERVOUDAKIS, L. K.; BARNABE,
412 V. H.; NICHI, M.; OLIVEIRA, C. A. Efeitos do estresse de trabalho sobre parâmetros
413 seminais de cães da raça Rottweiler. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal
414 Science*. São Paulo, v. 46, n. 4, p. 280-287, 2009.

- 415 BARROS, M.H.C., SHIOMI, H.H., AMORIM, L.S., SIQUEIRA, J.B., PINHO, R.O.,
416 LIMA, D.M.A., LOPES, P.S., GUIMARÃES S.E.F., & GUIMARÃES, J. D. (2013).
417 Viabilidade espermática do sêmen congelado de suínos da raça piau avaliada pelo teste
418 de termoresistência. *Acta Veterinaria Brasilica*, 7(2), 164 – 170.
- 419 CASTELO BRANCO, Y. N. T. C. Efeito da Suplementação dos Ácidos Oléico e
420 Palmítico e do Eugenol na Criopreservação de Sêmen Bovino. 2018. 116 f. Tese
421 (Doutorado em Ciência Animal) – Reprodução Animal, Universidade Federal do Piauí,
422 Piauí.
- 423 CBRA – COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, Manual para exame
424 andrológico e avaliação de sêmen animal. 3.ed. Belo Horizonte, 2013, 104p.
- 425 CHACUR, M. G. M. et al. Influência da adição de vitamina E em meios diluentes na
426 qualidade do sêmen fresco diluído, refrigerado e congelado em cães da raça Bulldog
427 Francês. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 45, p. 1–6, 2017.
- 428 COLETO, Z.F. Congelamento do sêmen da espécie canina adicionando antioxidantes. 2006.
429 103p. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) -Universidade Federal Rural de
430 Pernambuco, Pernambuco.
- 431 DÍAZ, R.; INOSTROZA, K.; RISOPATRON, J.; SANCHEZ, R.; SEPULVEDA, N.
432 Identification of fatty acids in canine seminal plasma. *Andrologia*. p. 1-4, 2013.
- 433 FUTINO DO, MENDES MCB, MATOS MNL, MONDADOR RG, LUCCI CM.
434 Glycerol, methyl-formamide and dimethyl-formamide in canine semen cryopreservation.
435 *Reprod Domest Anim*, v.45, p.214-220, 2010.
- 436 GUTHRIE, H.D.; WELCH, G.R. Determination of intracellular reactive oxygen species
437 and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using
438 fluorescence-activated flow cytometry. *J. Anim. Sci.*, v.84, p.2089-2100, 2006.
- 439 KIERNAN, M., FAHEY, A. G., & FAIR, S. (2013). The effect of the in vitro
440 supplementation of exogenous long-chain fatty acids on bovine sperm cell function.
441 *Reprod. Fertil. Dev.* 25, 947-954.
- 442 MADEIRA VLH, MONTEIRO CLB, BARBOSA CC, JUCÁ RP, OLIVEIRA AC,
443 UCHOA DC, SILVA LDM. Efeito de diferentes protocolos de descongelamento sobre o
444 sêmen canino criopreservado em diluidor à base de água de coco em pó (ACP®). *Cienc*
445 *Anim Bras* v.11, p.845-852, 2010.
- 446 MAKLOSKI CL. Clinical techniques of artificial insemination in dogs. *Vet Clin North*
447 *Am Small Anim Pract*, v.42, p.439-444, 2012.

- 448 MOURA, C.S.; CAVALCANTI, M.C.O.; GUERRA, M.M.P. et al. Teste de avaliação in
449 vitro e criopreservação do sêmen de cão utilizando diferentes diluidores. Ver. Bras. Ciênc.
450 Vet., v.9, p. 102-106, 2002.
- 451 NEILL, A. R.; MASTERS, C. J. Metabolism of Fatty Acids by Bovine Spermatozoa.
452 Biochem. J. v. 127, p. 375-385, 1972.
- 453 ORTEGA-FERRUSOLA, C.; GARCÍA, B.M.; GALLARDO-BOLAÑOS, J.M. et al.
454 Apoptotic markers can be used to forecast the freezeability of stallion spermatozoa. Anim.
455 Reprod. Sci., v.114, p.393-403, 2009.
- 456 PEIXOTO A.L.V.A., COLETO Z.F., MOURA C.S., ALMEIDA F.C., SOARES P.C.,
457 SILVA S.V. & GUERRA M.M.P. 2013. Efeito da adição de trolox e glutathione reduzida
458 na viabilidade in vitro de espermatozoides de cães. Ciência Animal Brasileira. 14(4): 436-
459 447.
- 460 ROTH, T.L.; WEISS, R.B.; BUFF, J.L. Heterologous in vitro fertilization and sperm
461 capacitation in an endangered African antelope, the Scimitar-Horned Oryx (*Oryx*
462 *dammah*). Biol. Reprod., v.58, p.475-482, 1998.
- 463 SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S.; SILVA, L. D. M. Influence of temperature during
464 glycerol addition and post-thaw dilution on the quality of canine frozen semen.
465 Reproduction in Domestic Animals, v. 41, n. 1, p. 74–78, 2006.
- 466 SILVA AR, FONTENELE-NETO JD, CARDOSO RCS, SILVA LDM, CHIRINÉA VH,
467 LOPES MD. Description of ultrastructural damages in frozen-thawed canine
468 spermatozoa. Cienc Anim Bras, v.10, p.595-501, 2009.
- 469 WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of
470 spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. Reprod. Fertil Dev., v. 7,
471 p. 871-891, 1995.
- 472 WITTAYARAT, M.; KIMURA, T.; KODAMA, R.; CHATDARONG,
473 K.;TECHAKUMPHU, M.; SATO, Y.; TANIGUCHI, M.; OTOI, T.; Long-term
474 preservation of chilled canine semen using vitamin c in combination with green tea
475 polyphenol. Cryo Lett, v.33, p.318-326, 2012.
476 26, 2012.