

## AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NO PLASMA SEMINAL DE CÃES FÉRTEIS E SUBFÉRTEIS APÓS SUPLEMENTAÇÃO ORAL COM VITAMINA C e E\*

Bethania Vieira Lopes<sup>1</sup>  
Gabriel Augusto Monteiro<sup>2</sup>  
Paula Payão Ovídio<sup>3</sup>  
Alceu Afonso Jordão Júnior<sup>4</sup>  
Maria Denise Lopes<sup>5</sup>

### RESUMO

Os espermatozoides são células altamente susceptíveis ao estresse oxidativo devido a grande concentração de ácidos graxos na composição de suas membranas. O estresse oxidativo ocorre devido a um desequilíbrio entre as concentrações de substâncias antioxidantes e oxidantes, o que pode levar a perda da capacidade fertilizante do espermatozoide. O objetivo deste trabalho foi avaliar, no plasma seminal, as taxas de peroxidação lipídica e a concentração das substâncias antioxidantes: Superóxido Dismutase (SOD), catalase, vitaminas C e E de cães férteis e subférteis após uma suplementação oral de vitamina C e E por 60 dias. Foram utilizados 13 cães de diferentes raças e idades que receberam ração comercial (Max Adulto – Royal Canin) por quatro meses. Nos últimos 60 dias, os animais receberam uma suplementação oral de 500mg de vitamina C e E, a qual foi adicionada na ração. O sêmen foi coletado por manipulação digital do pênis em três momentos, antes (M1), após 30 (M2) e 60 dias (M3) de suplementação. O plasma seminal foi obtido após centrifugação (18000g) do ejaculado e armazenado em tubos tipo *ependorf* em congelador a -20°C. Foram mensurados no plasma seminal o índice de peroxidação lipídica, através da análise das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), e as concentrações de SOD, catalase, vitamina C e E. A análise de peroxidação lipídica, das concentrações de SOD, catalase e vitamina C foram realizadas em espectrofotômetro em diferentes comprimentos de onda (532, 530, 230 e 520, respectivamente) sendo que para a avaliação da SOD utilizou-se um kit comercial (Frutosamina – Labtest®). A concentração da vitamina E foi realizada em aparelho de cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Os resultados mostraram diferença significativa entre os grupos de cães férteis e subférteis apenas no M1 (antes da suplementação oral). Não foi verificado diferença entre os grupos nos demais momentos. Em relação a concentração dos antioxidantes, não foi observado diferença significativa entre os grupos e entre os momentos. Baseado no exposto a suplementação oral com vitamina C e E nas dosagens de 500mg/dia por 60 dias não interferiu nas taxas de peroxidação lipídica (TBARS) e nas concentrações dos antioxidantes.

**Palavras-chave:** cães, subfertilidade, estresse oxidativo, suplementação oral.

\* Apoio financeiro: Fapesp e Royal Canin

<sup>1</sup> Doutoranda em Reprodução Animal da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita” Campus de Botucatu [bethania\\_lopes@hotmail.com](mailto:bethania_lopes@hotmail.com)

<sup>2</sup> Doutorando em Reprodução Animal da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita” Campus de Botucatu [gamonteiro@yahoo.com.br](mailto:gamonteiro@yahoo.com.br)

<sup>3</sup> Técnica do laboratório de Nutrologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto [ppayao@usp.br](mailto:ppayao@usp.br)

<sup>4</sup> Professor do departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto [alceu@fmrp.usp.br](mailto:alceu@fmrp.usp.br)

<sup>5</sup> Professora Titular do departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita” Campus de Botucatu [denise@fmvz.unesp.br](mailto:denise@fmvz.unesp.br)

Endereço para correspondência: Distrito de Rubião Júnior s/n, REPAS - FMVZ – UNESP - Botucatu. CEP: 18610-000. Telefone (14) 3811-6249

Pesquisa aprovada sem restrições pela Câmara de Ética em Experimentação Animal – CEEA - da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP Campus de Botucatu, sob o número 62/2007.

Lopes BV. et al. Avaliação do estresse oxidativo no plasma seminal de cães férteis e subférteis após suplementação oral com vitamina C e E. Vet. e Zootec. 2011 set.; 18(3): 452-461

## EVALUATION OF OXIDATIVE STRESS ON SEMINAL PLASMA FROM FERTILE AND SUBFERTILE DOGS AFTER ORAL SUPPLEMENTATION WITH VITAMIN C AND E

### ABSTRACT

Sperm cells are highly susceptible to oxidative stress due to a high concentration of fatty acid in the composition of their membranes. Oxidative stress occurs due to an imbalance between the concentrations of antioxidants and oxidants, which can lead to the loss of sperm fertilizing ability. The aim of this study was to evaluate, in seminal plasma, the rates of lipid peroxidation and concentration of antioxidants: Superoxide Dismutase (SOD), catalase, vitamins C and E, from fertile and subfertile dogs after an oral supplementation of vitamin C and E for 60 days. For that, it was used 13 dogs of different breeds and ages that were fed with commercial food (Max Adulto - Royal Canin) for four months. Over the past 60 days, animals received a diet added to oral supplementation of 500 mg vitamin C and E. Semen was collected by penis digital manipulation in three times before (M1), 30 (M2) and 60 days (M3) of supplementation. Seminal plasma was obtained after centrifugation (18000g) of the ejaculate and stored in Eppendorff tubes in a freezer at -20 ° C. It was measured in seminal plasma the index of lipid peroxidation, by analysis of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), and the concentrations of SOD, catalase, vitamin C and E. Analysis of lipid peroxidation, concentrations of SOD, catalase and vitamin C were performed using a spectrophotometer at different wavelengths (532, 530, 230 and 520, respectively) and for the evaluation of SOD it was used a commercial kit (Frutosamina - Labtest ®). The concentration of vitamin E was performed using a high-performance liquid chromatography (HPLC). The results showed significant differences between groups of fertile and infertile dogs only at M1 (before oral supplementation). There was no difference between groups in other moments. Regarding the concentration of antioxidants, there was no significant difference between groups and between moments. Based on the exposed, the oral supplementation with vitamin C and E in dosages of 500 mg / day for 60 days did not interfere on the rates of lipid peroxidation (TBARS) and antioxidant concentrations.

**Keywords:** dogs, subfertility, oxidative stress, oral supplementation.

## EVALUACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN EL PLASMA SEMINAL DE PERROS FÉRTILES Y SUBFÉRTILES DESPUÉS DE LA SUPLEMENTACIÓN CON VITAMINA C Y E

### RESUMEN

Los espermatozoides son muy sensibles al estrés oxidativo debido a la gran concentración de ácidos grasos presentes en sus membranas. El estrés oxidativo se produce debido al desequilibrio entre las concentraciones de las sustancias antioxidantes y oxidantes, lo que puede generar pérdida en la capacidad fértil de los espermatozoides. El objetivo de este estudio fue evaluar, en el plasma seminal, las tasas de peroxidación de lípidos y la concentración de antioxidantes: superóxido dismutasa (SOD), catalasa, vitaminas C y E, en perros fértiles y subfértiles después de la suplementación oral de vitamina C y E durante 60 días. Para este, hemos utilizado 13 perros de diferentes razas y edades que fueron alimentados con una dieta comercial (Max Adultos - Royal Canin) durante cuatro meses. Durante los últimos 60 días, los animales recibieron la dieta comercial en conjunto con una suplementación oral de 500 mg de vitamina C y E durante 60 días. El semen fue colectado por manipulación digital del pene en tres veces antes

(M1), 30 (M2) y 60 días (M3) de la suplementación. El plasma seminal se obtuvo a partir de la centrifugación (18000g) del eyaculado y se almacenó en tubos *Eppendorff* en un congelador a -20°C. En el plasma se midieron la peroxidación lipídica mediante análisis de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), y las concentraciones de SOD, catalasa, vitamina C y E. Los análisis de peroxidación lipídica, las concentraciones de SOD, catalasa y la vitamina C se realizaron en un espectrofotómetro en diferentes longitudes de onda (532, 530, 230 y 520, respectivamente) y para la evaluación de la SOD utilizó un kit comercial (fructosamina - Labtest®). La determinación de vitamina E se realizó mediante una cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Los resultados mostraron diferencias significativas entre los grupos de perros fértiles e infértiles sólo en M1 (antes de la suplementación oral). No hubo diferencias entre los grupos en otros momentos. En relación a la concentración de antioxidantes, no hubo diferencias significativas entre los grupos y entre los tiempos. Con base en lo anterior la suplementación oral con vitamina C y E en dosis de 500 mg / día durante 60 días no afectó los índices de peroxidación lipídica (TBARS) ni las concentraciones de antioxidantes.

**Palabras-clave:** perros, subfertilidade, estrés oxidativo, suplementación oral.

## INTRODUÇÃO

O espermatozóide possui na composição de sua membrana uma grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados, fato que o torna particularmente susceptível ao processo de estresse oxidativo. O estresse oxidativo é causado por um desequilíbrio entre a concentração de substâncias antioxidantes e das oxidantes, reconhecidas como espécies reativas de oxigênio (ROS) (1). Quando este desequilíbrio ocorre em grandes proporções, o espermatozóide perde sua capacidade fertilizante (2). O plasma seminal contém moléculas de alto e baixo peso molecular, incluindo antioxidantes enzimáticos como a Superóxido Dismutase (SOD) (3,4) e a catalase (5) e não enzimáticos como a vitamina C (6) e vitamina E (7). O plasma seminal é considerado, portanto, a principal defesa contra a toxicidade das ROS (8, 9), resguardando o espermatozóide com um sistema antioxidante capaz de preservar sua capacidade fertilizante (10).

A diminuição da concentração de ROS ou o aumento do sistema antioxidante reduz o estresse oxidativo e os danos causados por ele. A suplementação oral com moléculas antioxidantes aumenta a concentração dessas substâncias no plasma seminal reduzindo o estresse oxidativo durante a espermatogênese. A análise das substâncias antioxidantes e a avaliação da peroxidação lipídica poderão indicar a taxa de estresse oxidativo ao qual as células espermáticas estão sendo submetidas (2).

O objetivo dessa pesquisa foi avaliar as taxas de peroxidação lipídica e a concentração das substâncias antioxidante do plasma seminal: SOD, catalase, vitaminas C e E de cães férteis e subférteis após suplementação oral de vitamina C e E por 60 dias.

## MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados treze (n=13) cães de raças e idades variadas (entre 2 e 7 anos de idade, peso médio de 30 ± 12 Kgs) e todos se apresentavam clinicamente saudáveis. Nove animais eram provenientes do canil da Polícia Militar de Bauru e quatro de propriedades particulares da cidade de Botucatu. Todos os animais permaneceram nos seus locais de origem e foram alimentados com ração comercial (Maxi Adulto – Royal Canin) por quatro meses. Após dois meses do início do fornecimento desta ração, os animais receberam uma suplementação oral de 500mg de vitamina C e 500mg de vitamina E por 60 dias. Antes da suplementação, após 30 dias e 60 dias o sêmen foi coletado e avaliado (M1, M2 e M3, respectivamente). A colheita

de sêmen foi realizada pelo método de estimulação peniana descrito por Feldman & Nelson (11), sendo realizada sempre pelo mesmo técnico. Os animais foram divididos em dois grupos de acordo com o padrão de seu ejaculado: em férteis e subférteis. **Cães férteis:** (n=7) ejaculado com concentração e morfologia espermática dentro dos padrões recomendados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (12). **Cães subférteis:** (n=6) ejaculado com padrão abaixo do recomendado pelo CBRA, baixa concentração espermática ( $< 20 \times 10^6$  spz/mL) e/ou alto índice de patologias espermáticas ( $> 30\%$ ).

O sêmen foi centrifugado a 18.000g por 20 minutos para obtenção do plasma seminal. Em seguida as amostras de plasma seminal foram transferidas para tubo tipo *ependorff* e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento de sua análise. No momento das análises (M1, M2 e M3) as amostras de plasma seminal foram descongeladas e submetidas as seguintes avaliações:

**Taxa de peroxidação lipídica:** foi avaliada pela mensuração das substâncias reativas ao ácido tiobárbitorico (TBARS). Para esta análise seguiu-se o protocolo descrito por Buege & Aust (13). Este método se baseia na reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico com uma de malondialdeído (MDA), produzindo um complexo de coloração rósea que pode ser quantificado pela leitura em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 532nm. Esta reação ocorre em pH ácido e em temperaturas entre 90 e  $100^{\circ}\text{C}$ .

Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  de plasma seminal foi homogeneizada a 200  $\mu\text{L}$  de uma solução de ácido tricloroacético (15%) - ácido tiobarbitúrico (0,375%) - ácido clorídrico (0,25N), aquecido por 15 minutos em água fervente e resfriado em água, centrifugado por 10 minutos 1300g. O sobrenadante foi utilizado para quantificar os TBARS em espectrofotômetro (SpectraMax M5, Molecular Devices) em um comprimento de onda de 532nm. Os resultados obtidos foram comparados com uma curva padrão de MDA. A concentração dos TBARS foi determinada utilizando-se  $1,56 \times 10^5 \times \text{M} \cdot \text{mL}^{-1}$  como coeficiente de extinção molar de MDA. Os valores foram expressos em ng de TBARS/mL de plasma.

#### Mensuração das substâncias antioxidantes:

**Superóxido dismutase (SOD):** foi medida indiretamente pelo índice de inibição da SOD. Foi utilizado um kit comercial para dosagem de frutossamina (Labtest), proteína consumida pela SOD. A SOD foi portanto, mensurada a partir da concentração de frutossamina no plasma seminal, sem inibição e com inibição da ação da SOD. A análise foi realizada em espectrofotômetro (SpectraMax M5, Molecular Devices) utilizando um comprimento de onda de 530nm, após incubação da amostra a  $37^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos e depois realizada duas novas análises, uma após 5 minutos e outra após 10 minutos.

Os resultados obtidos sem a inibição da SOD foram considerados como 100%. Para a determinação do valor da SOD, foi realizada uma curva padrão, utilizando-se concentrações pré determinadas de SOD, utilizando a equação:  $y = 0,027x + 44,26$ . Onde y é a concentração de SOD em ng/mL e x o valor encontrado na porcentagem de inibição da SOD.

**Catalase:** Foi determinada em aparelho de espectrofotometria com comprimento de onda de 230nm a  $30^{\circ}\text{C}$ , avaliando-se o consumo de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 8 minutos (14). O meio de reação continha 10 $\mu\text{L}$  de plasma seminal, tampão Trisaminometano/EDTA (concentração final de 50nM e 250nM respectivamente), pH 8,0 e 900 $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (concentração final de 9,0nM).

Para os cálculos de concentração, utilizou-se o valor  $0,071\text{M} \cdot \text{cm}^{-1}$  como coeficiente de extinção molar do  $\text{H}_2\text{O}_2$ . A concentração de catalase foi expressa por ng/mL de plasma seminal.

**Vitamina E:** Uma alíquota de 200µL de plasma seminal foi adicionado a 100µL de etanol 100% com Butilhidroxitolueno (BHT) e 100µL de NaOH e homogeneizado em vórtex por 5 segundos. Em seguida adicionou-se 400µL de n-hexano e a mistura foi agitada por 2 minutos. A amostra foi centrifugada a 700 g por 5 minutos e em seguida cada amostra foi inserida em um novo tubo de ensaio contendo 200µL da fase hexânica.

As amostras foram secas em fluxo de nitrogênio e ressuspendidas em 200µL de fase móvel. Vinte microlitros deste preparado foi injetado no aparelho de cromatografia líquida de alta performance (HPLC). O comprimento de onda de excitação e emissão foi de 292 e 330nm, respectivamente.

Para quantificar o valor de vitamina E, 5 injeções do padrão interno (vitamina E em 5 diferentes concentrações: 2,5; 5; 10; 20 e 40 µMol/L) foram introduzidas no aparelho para definir o tempo de retenção e a área média obtida. Foi então obtida a curva padrão que forneceu uma equação,  $y = 0.0003x + 0,660$ , onde x representa o valor encontrado na área obtida e y a concentração de vitamina E, expresso em µMol/L.

**Vitamina C:** Seguiu-se o protocolo proposto por Bessey (15): Adicionou-se 400µL de ácido tricloroacético (5%) em 100µL de plasma seminal. Essa amostra foi centrifugada a 4° C, por 10 minutos a 908g. Em seguida retirou-se 60µL do sobrenadante transferindo essa alíquota para um tubo de ensaio onde adicionou-se 20µL do reagente de cor (DTC – dinitrofenilhidrazina+tiouréia+sulfato de cobre). Este procedimento foi realizado em triplicata. Após 4 horas de reação em banho de água a 37 °C adicionou-se 100µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 65%. A leitura foi realizada após 20 minutos em espectrofotômetro (SpectraMax M5, Molecular Devices), utilizando um comprimento de onda de 520 nm. A concentração de vitamina C foi realizada por meio de uma curva de calibração.

Em relação a Análise Estatística, foi utilizado a análise de variância com medidas repetidas com 2 fatores, para a análise de peroxidação lipídica (TBARS). Para as mensurações de Vitamina C, E e SOD foram utilizados o teste de Friedman para comparação dos 3 momentos e Teste de Mann-Whitney para comparação dos 2 grupos em cada momento.

## RESULTADOS

Os resultados estão apresentados nas tabelas de 1 a 4.

Tabela 1. Média ± desvio padrão obtidos da concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS – ng/mL) no plasma seminal dos animais pertencentes aos grupos fértil e subfértil nos três momentos analisados: M1, M2 e M3. Botucatu, 2010.

Grupo	Momento			p
	M1	M2	M3	
Fértil (n=7)	735,20 ± 153,80 <sup>A</sup>	554,70 ± 154.50	531,60 ± 158.90	0,162
Subfértil (n=6)	507,96 ± 161.13 <sup>B</sup>	499,11 ± 142.47	461,97 ± 136.51	0,683
<b>P</b>	<b>0,041</b>	0,516	0,419	

Letras maiúsculas diferentes na mesma coluna significam diferença estatística

M1: antes da suplementação oral com vitamina C e E

M2: após 30 dias de suplementação por via oral com vitamina C e

M3 com 60 dias de suplementação por via oral com vitamina C e E

Tabela 2. Média  $\pm$  desvio padrão dos resultados obtidos de Superóxido Dismutase (SOD – ng/mL) no plasma seminal dos animais pertencentes aos grupos fértil e subfértil nos três momentos analisados: M1, M2 e M3. Botucatu, 2010.

Grupo	Momento			p
	M1	M2	M3	
Fértil (n=7)	1303,93 $\pm$ 595,33	1287,08 $\pm$ 866,38	1060,95 $\pm$ 623,45	1,000
Subfértil (n=6)	1292,90 $\pm$ 322,74	724,34 $\pm$ 712,06	956,84 $\pm$ 560,69	0,472
P	1,000	0,366	0,945	

M1: antes da suplementação oral com vitamina C e E

M2: após 30 dias de suplementação por via oral com vitamina C e E

M3 com 60 dias de suplementação por via oral com vitamina C e E

Tabela 3. Média  $\pm$  desvio padrão dos resultados obtidos de vitamina E (micromol/L) no plasma seminal dos animais pertencentes aos grupos (fértil e subfértil) nos três momentos analisados: M1, M2 e M3. Botucatu, 2010.

Grupo	Momento			p
	M1	M2	M3	
Fértil (n=7)	12,63 $\pm$ 6,43	17,57 $\pm$ 1,90	13,23 $\pm$ 2,30	0,180
Subfértil (n=6)	11,85 $\pm$ 5,81	13,03 $\pm$ 5,85	11,92 $\pm$ 2,94	0,607
P	0,836	0,073	0,234	

Letras minúsculas diferentes na mesma linha significam diferença estatística

M1: antes da suplementação oral com vitamina C e E

M2: após 30 dias de suplementação por via oral com vitamina C e E

M3 com 60 dias de suplementação por via oral com vitamina C e E

Tabela 4. Média  $\pm$  desvio padrão dos resultados obtidos de vitamina C (micromol/mL) no plasma seminal dos animais pertencentes aos grupos (fértil e subfértil) nos três momentos analisados: M1, M2 e M3. Botucatu, 2010.

Grupo	Momento			p
	M1	M2	M3	
Fértil (n=7)	106,40 $\pm$ 25,97	133,10 $\pm$ 45,16	112,04 $\pm$ 16,52	0,607
Subfértil (n=6)	133,58 $\pm$ 58,78	192,93 $\pm$ 210,03	105,09 $\pm$ 34,56	0,311
P	0,589	0,836	0,534	

M1: antes da suplementação oral com vitamina C e E

M2: após 30 dias de suplementação por via oral com vitamina C e E

M3 com 60 dias de suplementação por via oral com vitamina C e E

## DISCUSSÃO

O plasma seminal é a principal fonte de defesa antioxidante para o espermatozóide (8, 9). A avaliação de TBARS no plasma seminal reflete o índice de estresse oxidativo ao qual este espermatozóide está exposto, podendo ser usado como um indicativo da necessidade ou não de uma suplementação oral com antioxidantes. Assim, objetivou-se neste experimento verificar eventuais diferenças existentes nos níveis de estresse oxidativo entre os animais férteis e subférteis. A hipótese era que no plasma seminal de cães subférteis existia uma maior concentração de TBARS e/ou uma menor concentração de substâncias antioxidantes.

Antes da suplementação oral, o grupo de animais férteis mostrou uma concentração de TBARS superior (735,20  $\pm$  153,80) ao do grupo subfértil (507,96  $\pm$  161,13), demonstrando que o ejaculado de cães com padrão normal apresenta uma taxa maior de peroxidação lipídica. A adição das vitaminas C e E na ração desses animais modificou esses resultados

umentando talvez a concentração de substâncias antioxidantes no plasma seminal o que foi suficiente para diminuir o TBARS no grupo fértil (Tabela 1).

A suplementação da dieta de coelhos com vitamina C, E e a sua associação, promoveu uma diminuição da formação de TBARS, indicando que a suplementação oral de antioxidante reduziu o estresse oxidativo no plasma seminal desses coelhos (16). A mesma situação foi observada em ratos suíços (17). Uma redução da taxa de peroxidação lipídica também foi observada em ratos Wistar quando suplementados apenas com a vitamina C (18).

Uma condição importante a ser discutida é a possibilidade dessa maior concentração de TBARS observada no plasma seminal do grupo fértil ser devida a uma concentração espermática também maior nesse grupo; assim quando maior o número de espermatozóide, maior a concentração de ROS e maior concentração de TBARS. Existe também a possibilidade de que outros antioxidantes, não mensurados neste experimento, como a glutatona peroxidase estejam em concentrações mais baixas no grupo fértil, contribuindo assim para um desequilíbrio das concentrações de oxidantes/antioxidantes.

Em estudo realizado com homens férteis e subférteis, também foi observado, uma maior taxa de peroxidação lipídica no sêmen de homens férteis (19). Ao contrário, um aumento da concentração de ROS no plasma seminal foi relatado como uma das causas da baixa qualidade do sêmen de humanos (20), hamster (21) e cães (22).

Não foi possível detectar a concentração de catalase do plasma seminal dos animais avaliados, corroborando com os resultados de Hatamoto et al. (23), que também não encontraram catalase no plasma seminal de cães da raça Rottweiler. Kawakami et al. (22) detectaram a presença desta enzima no plasma seminal de cães e observaram uma concentração mais baixa em animais com ejaculado abaixo do padrão desejado do que em animais considerados férteis (0,48 x 2,18 µ/mg de proteína, respectivamente). A catalase é uma enzima intracelular, por isso não deve estar presente em altas concentrações no plasma seminal (24, 25). Talvez o equipamento usado em nosso experimento não tenha sensibilidade suficiente para detectar pequenas concentrações de catalase.

Não houve diferença significativa entre os grupos fértil e subfértil na concentração dos antioxidantes avaliados (SOD, Vitamina C e E) no plasma seminal (Tabelas 2, 3 e 4, respectivamente). Ao contrário dos resultados de Kawakami et al. (22) que relataram uma concentração de SOD significativamente mais baixa no plasma seminal de cães com alto percentual de espermatozoides patológicos, baixa concentração e motilidade espermática do que naqueles sem alterações. Estes autores relacionaram a baixa motilidade espermática observada no ejaculado desses animais com a concentração reduzida de SOD. No presente experimento, os cães subférteis não apresentavam alteração de motilidade espermática, mas sim de concentração e morfologia espermática; talvez por isso não tenha sido observado diferença significativa na concentração de SOD entre os grupos experimentais (Tabela 2).

Não houve diferença significativa, entre os grupos, na concentração dos antioxidantes mensurados (SOD, vitamina C e vitamina E) no plasma seminal, em nenhum momento analisado, indicando, talvez, que a concentração dos antioxidantes utilizados na suplementação oral não tenha sido suficiente para alterar a concentração destas substâncias no plasma seminal. Ao contrário, Kawakami et al. (22) observaram menor atividade de SOD em cães astenozoospermicos do que nos considerados normais. Siciliano et al. (26) também observaram menor atividade de SOD em homens com problemas reprodutivos.

Corroborando com os resultados aqui apresentados, não foi observada nenhuma diferença significativa na atividade da SOD no plasma seminal de homens com e sem problemas reprodutivos (27, 28).

Em um estudo com cães submetidos a tratamentos com dexametasona e suplementação oral de vitamina E observou-se uma diminuição da concentração de TBARS. Os autores atribuíram seus resultados ao fato de que a suplementação oral com vitamina E diminuiu a

peroxidação lipídica protegendo a célula contra os efeitos deletérios da peroxidação lipídica (23).

Baseado no exposto observou-se que a suplementação oral com vitamina C e E nas dosagens de 500mg/dia por 60 dias não modificou o índice de peroxidação lipídica (TBARS) e nas concentrações dos antioxidantes avaliados nos dois grupos estudados e nos tres momentos avaliados (antes, durante e após a suplementação).

## REFERÊNCIAS

1. Sikka SC. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J Androl.* 2004;25:5-18.
2. Lanzafame F. Oxidative stress and medical antioxidant treatment in male infertility. *Reprod Biomed Online.* 2009;19:638-59.
3. Nissen HP, Kreysel HW. Superoxide dismutase in human semen. *Klin Wochenschr.* 1983;61:63-5.
4. Kobayashi T, Miyazaki T, Natori M, Nozawa S. Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa. *Hum Reprod.* 1991;6:987-91.
5. Lahnsteiner F, Mansour N, Plaetzer K. Antioxidant systems of brown trout (*Salmo trutta f. fario*) semen. *Anim Reprod Sci.* 2010;119:314-21.
6. Thiele JJ, Friesleben HJ, Fuchs J, Ochsendorf FR. Ascorbic acid and urate in human seminal plasma: determination and interrelationships with chemiluminescence in washed semen. *Hum Reprod.* 1995;10:110-5.
7. Therond P, Auger J, Legrand A, Jouannet P. Alphatocopherol in human spermatozoa and seminal plasma: relationships with motility, antioxidant enzymes and leukocytes. *Mol Hum Reprod.* 1996;2:739-44.
8. Lenzi A, Cualosso F, Gandini L, Lombardo F, Dondero F. Placebo-controlled, double-blind, cross-over trial of glutathione therapy, in male infertility. *Hum Reprod.* 1993;9:2044-50.
9. Balercia G, Armeni T, Mantero F, Principato G, Regoli F. Total oxyradical scavenging capacity toward different reactive oxygen species in seminal plasma and sperm cells. *Clin Chem Lab Med.* 2003;41:13-9.
10. Kim JG, Parthasarathy S. Oxidation and the spermatozoa. *Semin Reprod Endocrinol.* 1998;16:235-9.
11. Feldman EC, Nelson RW. Canine and feline endocrinology and reproduction. Philadelphia: W.B. Saunders; 2004.
12. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Belo Horizonte: CBRA; 1998.
13. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978;52: 302-10.

14. Beutler E. Red cell metabolism. 2nd ed. New York: Greene & Straton; 1975.
15. Bessey OA. Ascorbic acid microchemical methods. In: Vitamin methods. New York: Academic Press; 1960. v.1, p.303.
16. Yousef MI, Abdallah GA, Kamel KI. Effect of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. *Anim Reprod Sci.* 2003;76:99-111.
17. Mishra M, Acharya UR. Protective action of vitamins on the spermatogenesis in lead-treated Swiss mice. *J Trace Elem Med Biol.* 2004;18:173-8.
18. 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.* 2005;63:2063-72.
19. Schuffer A, Morshedi M, Oehninger S. Cryopreservation of fractionated, highly motile human spermatozoa: effect on membrane phosphatidylserine externalization and lipid peroxidation. *Hum Reprod.* 2001;16:2148-53.
20. Aitken RJ, Clarkson JS, Hargreave TB, Irvine DS, Wu FC. Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia. *J Androl.* 1989;10:214-20.
21. Chen H, Cheung MPL, Chow PH, O WS. Oxidative stress on the genomic integrity of epididymal and uterine sperm produced by male with all major accessory sex glands removed in the golden hamster. *Reproduction.* 2001;27:87.
22. Kawakami E, Takemura A, Sakuma M, Takano M, Hirano T, Hori T. Superoxide dismutase and catalase activities in the seminal plasma of normozoospermic and asthenozoospermic Beagles. *J Vet Med Sci.* 2007;69:133-6.
23. Hatamoto LK, Sobrinho BCA, Nichi M, Barnabe VH, Barnabe RC, Cortada CNM. Effects of dexamethasone treatment (to mimic stress) and vitamin e oral supplementation on the spermiogram and on seminal plasma spontaneous lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in dogs. *Theriogenology.* 2006;66: 1610-44.
24. Ball BA, Medina V, Gravance CG, Baumber J. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 °C. *Theriogenology.* 2001;56:577-89.
25. Calamera JC, Fernandez PJ, Buffone MG, Acosta AA, Doncel GF. Effects of long-term in vitro incubation of human spermatozoa: functional parameters and catalase effect. *Andrologia.* 2001;33:79-86.
26. Siciliano L, Tarantino P, Longobardi F, Rago V, De Stefano C, Carpino A. Impaired seminal antioxidant capacity in human semen with hyperviscosity or oligoasthenozoospermia. *J Androl.* 2001;22:798-803.
27. Hsieh Y, Chang C, Lin CS. Seminal malondialdehyde concentration but not glutathione peroxidase activity is negatively correlated with seminal concentration and motility. *Int J Biol Sci.* 2006;2:23-9.

28. Khosrowbeygi A, Zarghami N. Levels of oxidative stress biomarkers in seminal plasma and their relationship with seminal parameters. BMC Clin Pathol. 2007;7:6.

**Recebido em: 13/01/11**

**Aceito em: 19/07/11**