

SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO DE REFRIGERAÇÃO ESPERMÁTICA COM VITAMINA C E CATALASE EM SÊMEN OBTIDO DE CÃES JOVENS E IDOSOS*

Marina Landim Alvarenga¹
Bethânia Vieira Lopes¹
Viviane Helena Chirinéa¹
Rodrigo Freitas Bittencourt²
Maria Denise Lopes¹

RESUMO

O uso de sêmen refrigerado é uma boa opção na rotina clínica de inseminação, sendo um método prático e barato que permite melhor preservação da fertilidade quando comparado ao sêmen congelado. Contudo, o período de sobrevivência dos espermatozoides é curto. A adição de moléculas antioxidantes ao meio de diluição pode reduzir o estresse oxidativo durante o armazenamento e assim melhorar sua qualidade. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da adição da catalase e vitamina C ao diluente sobre a qualidade do sêmen canino refrigerado. Para isso foram utilizados cinco cães com idade variando de 2 a 5 anos, e cinco com mais de sete anos. O sêmen foi colhido e dividido em três amostras para a refrigeração nos meios controle (sem adição de antioxidante), com adição de vitamina C e com adição de catalase. Antes e após a refrigeração as amostras foram analisadas através do sistema computadorizado CASA, da análise da morfologia espermática e da integridade das membranas plasmática e acrossomal. No presente trabalho a única variável que se beneficiou da ação dos antioxidantes foi à integridade do acrossomo nas amostras de sêmen resfriado obtidas de animais idosos. Além disso, neste mesmo grupo a concentração de catalase utilizada parece ter tido um efeito deletério sobre parâmetros da motilidade espermática. Estes resultados reforçam a evidência de variações individuais na resposta a refrigeração espermática e indicam a necessidade de um maior número de estudos envolvendo animais com idades diferentes.

Palavras chave: antioxidante, sêmen refrigerado, cão

SUPPLEMENTATION OF VITAMIN C AND CATALASE FOR COOLING YANG AND AGED DOG'S SEMEN

ABSTRACT

The use of cooled semen is an option for clinical practice, since it's a practical and inexpensive method, which allows a good preservation of fertility. However, spermatozoa stored under refrigeration conditions become aged, losing fertilizing capacity. The addition of antioxidant molecules to cooling extenders could reduce oxidative stress during storage improving semen quality. The goal of this study was to analyze the effects of the addition of catalase and vitamin C over the quality of refrigerated semen. Semen from five dogs aging between 2 to 5 years and five with more than 7 years was used. After collection the ejaculates were divided into three samples, one diluted in the cooling extender (control without antioxidant), another diluted in the extender with vitamin C, and the last with extender with catalase. Before and after cooling all samples were analyzed by Computer Assisted

* Financiamento Fapesp

¹ Departamento de reprodução animal e radiologia veterinária, FMVZ- UNESP, Botucatu, SP

² Centro de estudos em reprodução animal e biotecnologicas, UNIME, Salvador, BA m_alvarenga@hotmail.com

Semen Analysis (CASA), sperm morphology and analysis of the plasmatic and acrosomal membrane integrity. In this study the only variable that has benefited from the action of antioxidants was the acrosome integrity in cooled samples obtained from aged animals. In addition, in this same group the concentration of catalase used seems to have had a deleterious effect on sperm motility parameters. These results provide additional evidence of individual variations in response to cooling suggesting the need for a larger number of studies involving experimental animals of different ages.

Keywords: antioxidant, cooled semen, dog

INCORPORACIÓN DE VITAMINA C Y CATALASA EN LA REFRIGERACIÓN DE SEMEN DE PERROS JÓVENES Y VIEJOS

RESUMEN

El interés en las técnicas de preservación de los espermatozoides y de la inseminación artificial ha crecido mucho en todo el mundo. La utilización del semen refrigerado es una opción para el uso en la rutina clínica, ya que es un método práctico, más barato, que preserva mejor la fertilidad y con el cual la inseminación puede ser hecha por la vía transvaginal. La principal desventaja del uso del semen refrigerado es el corto período de supervivencia de los espermatozoides, siendo necesaria la utilización de la muestra en aproximadamente 4,9 días después de la colecta. La incorporación de moléculas antioxidantes en el diluyente de semen refrigerado podría reducir el impacto del estrés oxidativo durante el proceso de almacenamiento espermático y así mejorar la calidad del semen, propiciando un mayor tiempo de supervivencia de los espermatozoides y la disminución de la dosis de inseminación. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la incorporación de la catalasa y de la vitamina C en el diluyente sobre la calidad del semen refrigerado de perros y comparar estos antioxidantes, enzimáticos o no (catalasa x vitamina C), en la calidad de semen refrigerado de perros. Para esto fueron utilizados 10 perros, cinco de ellos con edad entre 2 y 5 años (jóvenes) y cinco con más de siete años (mayores). El semen fue colectado por manipulación digital del pene, en embudo de plástico, acoplado en un tubo plástico graduado. El semen de todos los animales fue analizado utilizando la prueba hipoosmótica, marcadores fluorescentes, sistema computadorizado CASA, análisis de la morfología espermática e integridad acrosomal. Después, el semen fue dividido en tres muestras con el fin de ser sometidas a refrigeración a 5°C por 96 horas en los medios de refrigeración control (sin incorporación de antioxidante), con incorporación de vitamina C y con adición de catalasa. Después de este período de refrigeración los análisis fueron repetidos en todas las muestras. Los resultados fueron evaluados por el análisis de variancia y las diferencias fueron verificadas por la prueba de Tukey, siendo el nivel de significancia adoptado de 5%. Los resultados obtenidos demuestran que la única variable que fue beneficiada por la acción de los antioxidantes fue la integridad acrosómica. Se concluye que los oxidantes vitamina C y catalasa no actuaron positivamente en el proceso de refrigeración de semen de perros jóvenes y mayores.

Palabras clave: antioxidantes; semen refrigerado; perro.

REVISÃO DE LITERATURA

A técnica de inseminação artificial (AI) em cães pode ser utilizada como um meio alternativo à cobertura natural. Para sua realização deve-se coletar, analisar e preservar o sêmen. O interesse nas técnicas de preservação da célula espermática e de IA em cães vem crescendo e novas tecnologias estão sendo estudadas em todo mundo (1).

Sabe-se que o uso de sêmen congelado para a IA permite a preservação dos gametas por tempo ilimitado e possibilita, com isso, a multiplicação de potenciais genéticos valiosos. Contudo, em cães, a taxa de prenhes após a IA usando sêmen congelado é insatisfatória. Além disto, a inseminação com sêmen congelado é um procedimento sofisticado e necessita de técnicas e equipamentos específicos, uma vez que a deposição de sêmen deve ser intrauterina (1).

O uso de sêmen refrigerado seria, portanto, uma boa opção para a aplicação clínica, já que possui menor custo, é um método prático, permitindo melhor preservação da fertilidade e realização da inseminação via transvaginal. A limitação para o seu uso é o curto tempo de sobrevivência dos espermatozóides armazenados (2). As maneiras existentes para prolongar essa sobrevivência seriam a utilização de meios diluentes adequados, que ofereçam energia, manutenção do pH e osmolaridade, proteção da integridade do acrossomo e membrana plasmática e diminuição do metabolismo dos espermatozóides através do armazenamento à temperatura de 4 a 5 °C. Contudo, a fertilidade do sêmen refrigerado só é mantida por 12 a 24 horas (2), necessitando assim de estudos para desenvolver um método que preserve o sêmen por 4 a 5 dias, a fim de possibilitar um período de transporte prolongado.

Um dos obstáculos a ser contornado seria a peroxidação lipídica a qual os espermatozóides são submetidos durante o processo de refrigeração e armazenamento. O início e propagação da peroxidação lipídica são mediados pelos radicais livres, os quais são definidos como qualquer átomo, grupo atômico ou molécula que possui um elétron não pareado, ocupando uma orbita externa. Estas substâncias recebem o nome de espécie reativa de oxigênio (ROS) e quando em contato com os ácidos decosa-hexaenóicos presentes na membrana espermática dão início a chamada cascata de peroxidação que causa perda de fluidez da membrana e da capacidade de regular a concentração intracelular de íons envolvidos no controle da homeostase espermática (3).

As espécies reativas de oxigênio (ROS) presentes no ejaculado são produzidas pelos espermatozóides e por leucócitos (4,5). Contudo, os espermatozóides submetidos à refrigeração e armazenamento se tornam envelhecidos e tendem a sofrer a peroxidação lipídica, perdendo assim, algumas características principais para a manutenção da sua capacidade fertilizante.

As ROS podem causar, diretamente, a peroxidação lipídica, levando a queda na motilidade espermática e danos protéicos e de ácido nucléico levando a apoptose e a morte celular (6-8); ou indiretamente, causar estresse oxidativo devido à destruição dos antioxidantes citoplasmáticos. Apesar disso, pequenas quantidades de ROS são necessárias para a capacitação espermática (9) e processo de hiperativação (6, 10), sendo portanto, fundamentais durante a fertilização.

As enzimas antioxidantes produzidas pelo organismo como a superóxido desmutase, a catalase e a glutationaperoxidase são antioxidantes preventivos, por eliminarem as ROS envolvidas na iniciação das reações em cadeia. A catalase é a enzima que irá catalisar diretamente a decomposição do H₂O₂ ao oxigênio no estado fundamental (11). O ácido ascórbico (vitamina C) é um antioxidante não enzimático, que tem sido usado pela sua ação protetora contra o radical peroxil e também por proteger e regenerar a atividade da superóxido desmutase e do tocoferol (vitamina E). As propriedades antioxidantes do ácido ascórbico

permitem proteger as membranas celulares, proteínas, DNA e lipídios dos danos que as ROS podem causar (12).

Com isso, sugere-se que a adição de moléculas antioxidantes no meio de diluição do sêmen refrigerado reduziria o impacto do estresse oxidativo durante o processo de armazenamento espermático e assim melhoraria a qualidade do sêmen, propiciando um maior tempo de sobrevivência dos espermatozóides e diminuição da dose inseminante do sêmen refrigerado (13).

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adição da catalase e da vitamina C ao meio diluente sobre a qualidade do sêmen refrigerado de cães jovens e idosos.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparação dos meios diluentes

Foram preparados três meios diluentes a base de gema de ovo para a refrigeração do sêmen, sendo eles, um meio controle (sem antioxidante), um meio com adição de 1 mM de vitamina C e outro com adição de 300U/ml decatalase. Após a preparação os meios foram armazenados em freezer e aquecidos em banho-maria a 37°C no momento da diluição do sêmen.

Coleta do sêmen

Foi realizada a coleta do sêmen de 10 cães, 5 jovens (2 a 5 anos) e 5 idosos (mais de 7 anos). O sêmen foi colhido no próprio criatório e transportado imediatamente até o Laboratório de Reprodução de Pequenos Animais e Silvestres (REPAS), para análises e processamento.

Após a limpeza do prepúcio com uso de uma compressa, o sêmen foi colhido por manipulação digital do pênis, na ausência de uma fêmea no estro, em funil plástico, acoplado a um tubo plástico graduado. O transporte foi realizado em uma garrafa térmica com água aquecida (35°C) e protegido da luz.

A primeira fração do sêmen foi desprezada, e a segunda e terceira fração foram utilizadas para as análises morfofuncionais e processamento.

Análise do sêmen

A morfologia espermática foi avaliada através da confecção de esfregaços em lâminas, coradas pelo método de Karras modificado. A avaliação da integridade das membranas plasmáticas foi realizada através da utilização de sondas fluorescentes.

A análise funcional do sêmen foi realizada pela avaliação da motilidade, vigor espermático, concentração espermática e teste hiposmótico. A motilidade e vigor espermático do sêmen foram avaliados colocando-se uma gota de sêmen em uma lâmina aquecida a 38°C e recobrimo com uma lamínula para a observação em microscópio de contraste de fase. O resultado foi expresso em porcentagem (0 a 100%) para espermatozóides com movimento progressivo e um escore de 0 a 5 para o vigor. O teste hiposmótico constituiu em misturar 0,1ml de sêmen em 0,9ml de solução hiposmótica (150 mOsmol) e 0,1 ml de sêmen em 0,9ml de solução isosmótica (300 mOsmol), o resultado foi dado em porcentagem pela subtração dos espermatozóides com cauda enrolada na solução hiposmótica dos espermatozóides com cauda enrolada na solução isosmótica.

A concentração espermática, assim como as análises dos parâmetros espermáticos relacionados à cinética do movimento foram avaliadas através do sistema computadorizado CASA.

Após essas análises, o restante do sêmen foi diluído 1:1 em meio controle, dividido em três frascos e submetido à centrifugação. O sobrenadante foi descartado e os pellets foram ressuspensos utilizando o meio controle, o meio com vitamina C e o meio com catalase, um em cada frasco. As amostras foram submetidas à refrigeração a 5°C por 96 horas e as análises foram repetidas.

Foram comparados os parâmetros dos três grupos de tratamento dos cães jovens e idosos separadamente e entre os grupos (jovens e idosos).

Os resultados foram avaliados pela análise de variância e as diferenças foram verificadas pelo Teste de Tukey, sendo o nível de significância adotado de 5%.

RESULTADOS

Tabela1. Média e desvio padrão das análises de morfologia e integridade estrutural dos espermatozoides frescos (T0) e refrigerados (T96) obtidos de animais jovens e idosos.

Análise	Jovens				Idosos			
	T0	T96- Controle	T96- Vit. C	T96- Catalase	T0	T96- Controle	T96- Vit. C	T96- Catalase
Teste Hiposmótico (%)	81,8 ± 10,66 _a	69,8 ± 15,35 _a	69,6 ± 12,38 _a	69,0 ± 11,83 _a	55,0 ± 33,53 _a	45,4 ± 22,86 _a	45,2 ± 29,74 _a	44,0 ± 31,26 _a
Fluorescência (%)	89,4 ± 6,62 _a	72,2 ± 18,39 _a	78,8 ± 14,11 _a	71,8 ± 24,03 _a	81,4 ± 8,9 _a	68,6 ± 9,5 _a	67,4 ± 6,58 _a	75,2 ± 10,08 _a
Defeitos Maiores (%)	4,6 ± 5,6 _a	5,0 ± 3,53 _a	4,0 ± 4,58 _a	4,0 ± 4,36 _a	20,8 ± 15,06 _a	27,4 ± 17,85 _a	21,2 ± 18,32 _a	27,2 ± 14,67 _a
Defeitos Menores (%)	6,4 ± 4,5 _a	6,4 ± 4,5 _a	8,2 ± 4,2 _a	7,4 ± 1,34 _a	11,8 ± 8,26 _a	6,2 ± 4,87 _a	20,4 ± 22,85 _a	28,6 ± 19,91 _a
Integridade de Acrossomo (%)	99,8 ± 0,45 _a	99,0 ± 1,0 _{ab}	99,6 ± 0,89 _{ab}	97,6 ± 3,78 _{ab}	98,2 ± 1,79 _{ab}	94,6 ± 1,82 _b	95,4 ± 2,88 _{ab}	94,8 ± 4,32 _{ab}

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si a $P < 0,05$ pelo teste de Tukey

Tabela 2. Média e desvio padrão da motilidade e cinética dos espermatozoides frescos (T0) e refrigerados (T96) obtidos de animais jovens e idosos.

Análise	Jovens				Idosos			
	T0	T96- Controle	T96- Vit. C	T96- Catalase	T0	T96- Controle	T96- Vit. C	T96- Catalase
Motilidade Total (%)	85,6 ± 8,99 _a	87,2 ± 7,82 _a	76,0 ± 14,81 _a	84,2 ± 6,72 _a	79,2 ± 13,86 _a	77,6 ± 12,26 _a	62,4 ± 20,84 _a	62,6 ± 19,94 _a
Motilidade Progressiva (%)	70,8 ± 11,03 _{ab}	75,8 ± 12,27 _a	60,8 ± 17,55 _{ab}	71,0 ± 6,52 _{ab}	61,6 ± 16,65 _{ab}	62,2 ± 9,88 _{ab}	45,6 ± 25,18 _{ab}	42,6 ± 16,83 _b
VAP (µm/s)	124,1 ± 18,01 _a	111,96 ± 17,46 _{ab}	106,82 ± 23,44 _{ab}	108,62 ± 14,57 _{ab}	121,34 ± 28,01 _{ab}	103,48 ± 12,41 _{ab}	88,9 ± 19,39 _{ab}	84,24 ± 9,73 _b
VSL (µm/s)	110,68 ± 17,82 _a	100,2 ± 17,42 _a	92,9 ± 20,48 _a	96,52 ± 13,6 _a	106,1 ± 27,67 _a	90,4 ± 9,08 _a	77,86 ± 16,77 _a	75,14 ± 9,21 _a
VCL (µm/s)	155,64 ± 25,12 _a	138,54 ± 20,41 _a	146,5 ± 41,32 _a	136,78 ± 19,91 _a	164,02 ± 20,91 _a	135,8 ± 22,28 _a	124,98 ± 26,28 _a	112,76 ± 15,47 _a
Área (µm²)	5,26 ± 0,95 _{ac}	4,2 ± 0,24 _b	4,2 ± 0,4 _b	4,36 ± 0,36 _{ab}	5,56 ± 0,11 _c	4,48 ± 0,34 _{ab}	4,52 ± 0,53 _{ab}	4,28 ± 0,44 _{ab}
Rápidos (%)	80,8 ± 11,92 _a	83,0 ± 11,51 _a	68,4 ± 19,94 _{ab}	78,2 ± 6,87 _{ab}	72,2 ± 16,53 _{ab}	70,4 ± 13,24 _{ab}	50,6 ± 28,39 _{ab}	46,0 ± 18,12 _b

Médias seguidas de letras diferentes na mesma linha diferem entre si a $P < 0,05$ pelo teste de Tukey

DISCUSSÃO

A análise dos defeitos maiores e menores dos espermatozoides frescos e congelados de cães com idades diferentes mostrou similaridades entre os grupos (Tabela 1). Da mesma forma, não foram observadas diferenças entre a porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática intacta, tanto através do teste hiposmótico, como através da análise com sondas fluorescentes (Tabela 1). Entretanto, quando a integridade acrossomal foi avaliada, observou-se que espermatozoides de animais idosos quando submetidos à refrigeração na ausência de antioxidantes apresentavam uma maior porcentagem de lesão acrossomal em comparação com o controle fresco de animais jovens (Tabela 1). Quando os antioxidantes foram adicionados à amostra de sêmen essa diferença desapareceu (Tabela 1).

No presente experimento os parâmetros de motilidade e cinética espermática foram avaliados através da análise computadorizada (CASA). A motilidade total foi semelhante entre os grupos estudados, não se observando efeito da idade dos animais ou do protocolo de refrigeração (Tabela 2). Entretanto, observou-se uma menor motilidade progressiva nas amostras de sêmen de animais idosos resfriadas com catalase em comparação ao sêmen de animais jovens resfriado sem adição de antioxidantes (Tabela 2). Da mesma forma, as amostras obtidas de animais idosos e refrigeradas com catalase tiveram uma menor velocidade média (VAP) em comparação ao controle fresco de animais jovens.

Quando comparado separadamente os grupos de animais, de acordo com a idade observou-se que o único parâmetro que apresentou diferença significativa entre as análises do sêmen no grupo dos animais jovens foi a área de cabeça (Tabela 2). Nesse parâmetro o sêmen fresco apresentou resultados significativamente superiores em relação ao controle refrigerado e ao sêmen refrigerado com antioxidantes.

Da mesma forma, no grupo dos animais idosos (Tabela 2), o único parâmetro que apresentou diferença significativa entre as amostras foi, novamente, a área de cabeça, onde o sêmen fresco foi significativamente superior em relação ao controle refrigerado, ao sêmen refrigerado com antioxidantes.

Todas as amostras de sêmen coletadas apresentaram boa qualidade, não diferindo de acordo com a idade do animal. De fato, não é esperado que ocorra diminuição da motilidade espermática de acordo com a idade dos animais (14, 15). Da mesma forma a patologia espermática não é afetada (16) ou até diminui com o aumento da idade (17). Estes resultados foram confirmados no presente experimento, uma vez que a porcentagem de espermatozoides apresentando defeitos maiores e menores não foi diferente entre os grupos de animais estudados.

É esperado que o resfriamento espermático leve a uma deteriorização do sêmen. Esta deteriorização passa a ser evidente após 12 a 24 horas de armazenagem sendo constante e gradual (2). Este efeito, entretanto, não foi observado no presente experimento, tanto em animais jovens como em idosos. As análises de integridade de membrana, realizadas após 96 horas de resfriamento, demonstraram similaridades entre os resultados, tanto na avaliação do teste hiposmótico, como das sondas fluorescentes.

A integridade da membrana acrossomal também não foi afetada pelo resfriamento quando foram analisados isoladamente os animais jovens. Por outro lado, foi observada uma diminuição significativa da integridade da membrana acrossomal em espermatozoides de animais idosos submetidos a refrigeração, em comparação com o sêmen fresco de animais jovens. Este aumento da lesão acrossomal foi revertido pela adição das substâncias antioxidantes indicando um efeito benéfico das mesmas. Estes achados concordam com aqueles descritos por Maxwell e Strojnov(18) que demonstraram um efeito positivo da catalase sobre a preservação das membranas espermáticas em sêmen ovino resfriado a 5°C. Uma explicação para isso é o fato dos antioxidantes restaurarem o equilíbrio entre a quantidade de ROS produzido e eliminado preservando a integridade metabólica e estrutural das células (19).

Entretanto vale ressaltar que no presente experimento os efeitos benéficos da adição de antioxidantes foram pouco evidente. A adição de antioxidantes a meios de congelação de sêmen tem se mostrado eficiente para proteção das membranas e da motilidade espermática (20). Entretanto, seu uso em sistemas de refrigeração espermática ainda é controverso. Este efeito contraditório parece estar associado a diferenças na peroxidação lipídica entre as espécies, relacionado, principalmente a variações na constituição da membrana espermática e na concentração de antioxidantes do plasma seminal. Além disso, o insulto oxidativo provavelmente afeta as diferentes estruturas espermáticas de forma diversa ressaltando as variações entre espécies, e indivíduos (21). Adicionalmente Bucak e Tekin(22) ressaltam que a estabilização da membrana por outros componentes do meio de resfriamento, como por exemplo, a gema de ovo, é mais efetiva na proteção contra os efeitos do abaixamento da temperatura do que os antioxidantes.

Tanto no grupo de animais jovens como idosos, a área da cabeça espermática foi significativamente maior quando o sêmen foi analisado fresco. Este resultado indica que o processo de refrigeração talvez tenha influenciado a área de cabeça dos espermatozoides por alterar o estado de hidratação das células. A osmolaridade do meio utilizado para a refrigeração foi de 279 mmOsm o que é semelhante à fisiológica para o sêmen de cão (280/300 mmOsm). Apesar de durante a refrigeração o dano criobiológico imposto às células ser muito menor que o da congelação, danos osmóticos podem ocorrer. Além disso, o longo tempo de armazenamento do sêmen resfriado pode ter ressaltado essa alteração pois nestas condições, a membrana espermática, está sujeita a uma reestruturação durante a mudança de fase dos fosfolípidios (22).

Quando comparamos os grupos dos animais jovens com os dos idosos, observamos que a motilidade progressiva e o VAP do sêmen dos animais idosos refrigerado com adição de catalase apresentou o pior resultado. Este resultado concorda parcialmente com o obtido por Camara et al. (23) que observou uma menor motilidade do sêmen resfriado de carneiros

tratado com 400U/mL em comparação com o uso de 100 a 200U/mL de catalase. Trabalhos realizados com eqüinos e bovinos, também não tiveram resultados positivos com a adição de catalase no meio de refrigeração (24-26). Além disso, Beccaglia et al. (27) também mostraram que a adição de catalase nas concentrações de 150 UI/ml e 450 UI/ml não influenciou positivamente a qualidade do sêmen de cães refrigerado por 4 dias a 5°C. Contudo, Michael et al. (28) relataram que a adição de catalase na concentração de 100UI/ml afetou positivamente a qualidade do sêmen canino refrigerado por 72h. No presente experimento somente foi testada a concentração de 300u/mL e esta pode ter apresentado um efeito toxico particularmente evidente nas amostras de sêmen dos animais idosos.

A vitamina C não apresentou efeito sobre o sêmen de nenhum dos grupos. Este resultado é semelhante ao relatado por Aurich et al. (24), Ball et al. (25) e Michael et al. (28). Além disto, Michael et al.(28)concluíram que concentrações superiores a 1 mM de vitamina C influenciaram negativamente a qualidade do sêmen de cães refrigerado a 4°C. Estes resultados são opostos aos relatados em humanos, onde a deficiência de vitamina C foi associada ao aumento de anormalidades espermáticas e diminuição da motilidade. Contudo, os cães, diferentemente dos humanos, produzem quantidade adequada de vitamina C para suprir suas necessidades metabólicas (29).

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste experimento não demonstram ação evidente dos antioxidantes sobre a qualidade do sêmen canino resfriado. Entretanto, o sêmen obtido de animais idosos se mostrou mais sensível ao tratamento, uma vez que única variável que se beneficiou da ação dos antioxidantes foi a integridade de acrossomo nas amostras de sêmen resfriado obtidas de animais idosos. Da mesma forma, neste mesmo grupo a concentração de catalase utilizada parece ter tido um efeito deletériosobre parâmetros da motilidade espermática. Estes resultados reforçam as variações individuais na resposta a refrigeração espermática e indicam a necessidade de um maior número de estudos envolvendo animais com idades diferentes.

AGRADECIMENTO

Apoio financeiro FAPESP.

REFERÊNCIAS

1. Johnston SD, Kustritz MVR, Olson PNS. Canine and feline theriogenology. Philadelphia: Ray Kersey; 2001.
2. Linde-Forsberg C. Artificial insemination with fresh, chilled extended, and frozen-thawed semen in the dog. *Semin Vet Med Surg Small Anim.* 1995;10:48-58.
3. Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction.* 2001;122:497-506.
4. 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.
5. Griveau JF, Le Lannou D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Int J Androl.* 1997;20:61-9.

6. Agarwal A, Prabakaran S, Allamaneni S. What an andrologist/urologist should know about free radicals and why. *Urology*. 2006;67:2-8.
7. Kovalski NN, De Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species generated by human neutrophils inhibit sperm motility: protective effect of seminal plasma and scavengers. *FertilSteril*. 1992;58:809-16.
8. Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel-hafez MA, Thomas AJ, et al. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod*. 2004;19:129-38.
9. Saleh RA, Agarwal A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practise. *J Androl*. 2002;23:737-52.
10. Aitken RJ, Fisher H. Reactive Oxygen Species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays*. 1994;16:259-67.
11. Bustamante Filho IC. Estresse oxidativo na criopreservação do sêmen equino [dissertação]. Porto Alegre: Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2006.
12. Luck MR, Jeyaseelan I, Sholes RA. Minireview ascorbic acid and fertility. *BiolReprod*. 1995;52:262-6.
13. Linde-Forsberg C. Achieving canine pregnancy by using frozen or chilled extended semen. *Vet Clin North Am*. 1991;21:545-51.
14. Diarra MS, Pare JP, Roy G. Genetic and environmental factors affecting semen quality of young Holstein bulls. *Can J Anim Sci*. 1997;77:77-85.
15. Mathevon M, Buhr MM, Dekkers JCM. Environmental, management and genetic factors affecting semen production in Holstein bulls. *J Dairy Sci*. 1998;81:3321-30.
16. Chandler JE, Adkinson RW, Hay GM, Crain RL. Environmental and genetic sources of variation for seminal quality in mature Holstein bulls. *J Dairy Sci*. 1985;68:1270-9.
17. Soderquist L, Janson L, Haard M, Einarsson S. Influence of season, age, breed and some other factors on the variation in sperm morphological abnormalities in Swedish dairy AI bulls. *AnimReprod Sci*. 1996;44:91-8.
18. Maxwell WMC, Stojanov T. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. *ReprodFertil Dev*. 1996;8:1013-20.
19. De Lamirande E, Gagnon C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *HumReprod*. 1995;10:15-21.
20. Bucak MN, Atessahim A, Yüce A. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freezing-thawing process. *SmallRumin Res*. 2008;75:128-34.
21. Peña FJ, Johannisson A, Wallgren M, Rodriguez Martinez H. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane

- potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *AnimReprod Sci.* 2003;78:85-98.
22. Bucak MN, Tekin N. Protective effect of taurine, glutathione and trehalose on the liquid storage of ram semen. *Small Rumin Res.* 2007;73:103-8.
 23. Câmara DR, Mello-Pinto MMC, Pinto LC, Brasil OO, Nunes JF, Guerra MMP. Effects of reduced glutathione and catalase on the kinematics and membrane functionality of sperm during liquid storage of ram semen. *Small Rumin Res.* 2011;100:44-9.
 24. Aurich JE, Schonherr U, Hoppe H, Aurich C. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. *Theriogenology.* 1997;48:185-92.
 25. 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.
 26. Lindemann CB, O'Brien JA, Giblin FJ. An investigation of the effectiveness of certain antioxidants in preserving the motility of reactivated bull sperm models. *BiolReprod.* 1988;38:114-20.
 27. Beccaglia M, Anastasi P, Chigioni S, Luvoni GC. Tris-lecithin extender supplemented with antioxidant catalase for chilling of canine semen. In: *Proceedings of the 6th International Symposium on Canine and Feline Reproduction and Proceedings of the 6th Biennial Congress European Veterinary Society for Small Animal Reproduction; 2008, Vienna. Vienna: EVSSAR; 2008.*
 28. Michael AJ, Alexopoulos C, Pontiki EA, Hadjipavlou-Litina DJ, Saratsis P, Ververidis HN, et al. Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. *AnimReprod Sci.* 2008;112:119-35.
 29. Earle KE. Antioxidant nutrients: their role in a healthy diet. *Vet Int.* 2000;12:2-7.

Recebido em: 14/04/2013

Aceito em: 07/11/2013