

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Isabela Carla da Silva Ferreira

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO ESPERMATOZOIDE CANINO
CRIOPRESERVADO COM DILUIDOR ACRESCIDO DE L- CARNITINA

Belo Horizonte

2023

Isabela Carla da Silva Ferreira

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO ESPERMATOZOIDE CANINO
CRIOPRESERVADO COM DILUIDOR ACRESCIDO DE L- CARNITINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Monique de Albuquerque Lagares.

Belo Horizonte
2023

F383a Ferreira, Isabela Carla da Silva, 1988-
Avaliação da qualidade do espermatozoide canino criopreservado com diluidor acrescido de L-carnitina/ Isabela Carla da Silva Ferreira.-2023.
59 f: il.

Orientadora: Monique de Albuquerque Lagares
Dissertação (Mestrado) apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da UFMG, como requisito parcial para obtenção do título de Mestra em Ciência Animal.

Inclui Bibliografia.

1. Canino – Reprodução - Teses – 2. Sêmen – Criopreservação - Teses – 3. sêmen congelado – Teses – 4. Sêmen fertilidade – Teses – I. Lagares, Monique de Albuquerque - II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária - IV. Título.

CDD – 636.7

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes CRB 2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, UFMG.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO - ISABELA CARLA DA SILVA FERREIRA

Às 14:00 horas do dia 31 de maio de 2023, reuniu-se, na Escola de Veterinária da UFMG a Comissão Examinadora de Dissertação, para julgar, em exame final, a defesa da dissertação intitulada:

“AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO ESPERMATOZOIDE CANINO CRIOPRESERVADO COM DILUIDOR ACRESCIDO DE L-CARNITINA”

Como requisito final para a obtenção do Grau de **Mestre em Ciência Animal**, área de concentração em **Reprodução Animal**. Abrindo a sessão, o(a) Presidente da Comissão, **Profa. Monique de Albuquerque Lagares**, após informar o aos presentes o teor das Normas Regulamentares da Defesa de Dissertação, passou a palavra ao candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento da dissertação, tendo sido atribuídas as seguintes indicações:

Examinador / Prof. (a) / Dr. (a)	Aprovado(a)	Reprovado(a)
Monique de Albuquerque Lagares	x	
André Belico de Vasconcelos	x	
Marcelo Rezende Luz	x	

Face os resultados, o (a) aluno (a) foi considerado(a):

Aprovado(a)	x	Reprovado(a)	
-------------	---	--------------	--

Para concluir o Mestrado, o(a) candidato(a) deverá entregar a versão final da dissertação, acatando, se houver, as modificações sugeridas pela banca, e a comprovação de submissão de pelo menos um artigo científico em periódico recomendado pelo Colegiado dos Cursos. Para tanto, terá o prazo máximo de 60 dias a contar da data da defesa.

O resultado final, foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo(a) Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o(a) Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 31 de maio de 2023.

Assinatura dos membros da banca:



Documento assinado eletronicamente por **Monique de Albuquerque Lagares, Professora do Magistério Superior**, em 01/06/2023, às 16:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **André Belico de Vasconcelos, Usuário Externo**, em 05/06/2023, às 11:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Rezende Luz, Professor do Magistério Superior**, em 07/08/2023, às 14:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2344223** e o código CRC **C06E10F7**.

*Aos cães de trabalho, seres fenomenais,
que contribuem silenciosamente para a
evolução da humanidade.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre me guiar e me dar forças para lutar e ao meu Santo Expedito, guerreiro, que me ensina a importância do hoje, do agora e de não deixar nada para depois.

A minha Mãe, a mulher mais forte e doce desse mundo, meu exemplo diário de amor, respeito, fé e alegria. Mãe, você é meu combustível.

As minhas Irmãs, parte de mim e presentes em tudo que faço. Fernanda, você sempre foi meu exemplo de dedicação, vontade e responsabilidade. Flávia, minha segunda mãe, firme e forte, um espírito materno gigantesco que defende os seus com unhas e dentes, obrigada por toda proteção e carinho.

Ao irmão que a vida me deu, Vitor, obrigada por fazer parte da nossa família e trazer tranquilidade e equilíbrio para nossa convivência.

Ao meu Pai, por compartilhar o amor pelos animais e me incentivar a viver a Veterinária.

Ao William, meu melhor amigo e também meu amor, obrigada por tanto. O seu apoio faz toda diferença para eu continuar crescendo e seguir meus sonhos e objetivos.

As minhas “filhas”, Anninha, Carol e Malu, que são luz na minha vida e me estimulam a ser uma pessoa melhor a cada dia!

Aos meus familiares por sempre acreditarem em mim, meus avós: Vovó Juracy pelas incansáveis orações; Vovô Toninho pela alegria do fim de semana; Vovó Pedra que mesmo distante seu amor me alcança; Vovô Iodagil por me iluminar. Minhas tias que participaram da minha criação, Titia Valéria e Doinha, eu amo vocês! Aos meus primos, meus irmãos, somos uns pelos outros.

A minha orientadora, Professora Monique, que viveu essa jornada comigo e que me permitiu desenvolver e aprofundar na reprodução de cães.

Ao Vinícius, amigo que a pós-graduação me deu, que permitiu que essa jornada fosse mais leve e que me auxiliou em todas as etapas desse projeto. Você é demais, não tenho como te agradecer por tudo que fez por mim.

A Natália, obrigada por toda paciência e todo apoio desde o início nessa trajetória, você é uma pessoa brilhante e o sucesso é consequência.

Aos meus queridos amigos que desde a graduação eu não os deixo em paz: Carlos, meu Carlitos, obrigada por me ajudar tanto. Haryany, minha pequetita, esteve

sempre presente nos momentos mais importantes da minha vida, você é demais, tenho muito orgulho de ser sua amiga. Juliana, Ju, minha pirata do arrocha, obrigada por todo apoio sempre e por ser presente na minha vida, te admiro muito. Joana, minha Juca, obrigada por sempre me socorrer e me ajudar na vida clínica. Vanessa, Vah, Xucruta, obrigada por sempre estar comigo e não me deixar desistir, amigo é amigo...

Ao Paulo e Fernanda, meus queridos amigos, que me ajudaram desde o início nesse projeto e que contribuíram muito para que fosse possível.

Ao Exército Brasileiro que na figura do Grego, amigo que a caserna me deu, me ajudou a construir esse projeto.

A minha família militar, NUTRA, que incansavelmente estiveram sempre ao meu lado, me protegendo e me incentivando. Os senhores foram minha base para eu iniciar e desenvolver toda minha pesquisa e amor pelos cães de trabalho.

Aos professores do Setor de Reprodução da Escola de Veterinária UFMG pelo conhecimento compartilhado.

Aos cães, os seres mais apaixonantes do universo, que nos ensinam diariamente valores básicos como lealdade e sinceridade. Obrigada por todo ensinamento.

A todas as pessoas que passaram pela minha vida durante esse percurso e que de alguma forma contribuíram para minha formação.

*“Existe uma força mais poderosa que a eletricidade,
o vapor e a energia atômica: a vontade.”*

Albert Einstein

Resumo

A demanda da inseminação artificial com sêmen criopreservado canino tem aumentado. No entanto, a qualidade espermática e a fertilidade ainda são inferiores à do sêmen resfriado. Durante o processo de congelamento há necessidade do descarte de grande parte do plasma seminal para redução da capacitação espermática *in vitro*. No entanto, isto aumenta a vulnerabilidade espermática ao estresse oxidativo. Portanto, a adição de substâncias antioxidantes ao meio de congelamento de sêmen canino que aumentem o metabolismo espermático é de grande interesse para aumento da qualidade do sêmen congelado de cães. O presente estudo teve como objetivo aumentar a qualidade do sêmen congelado canino com a adição de 5-, 7,5- e 10-mM de L-carnitina (LC) ao diluidor de congelamento de sêmen modificado com 2 % de gema de ovo. A qualidade do sêmen pós-descongelamento foi avaliada *in vitro* quanto a motilidade e cinemática espermática, funcionalidade e integridade de membrana plasmática (MP), reação acrossômica espontânea, peroxidação lipídica, morfologia espermática e concentração de peróxido de hidrogênio, nitrito e malonaldeído no sêmen. As médias e o erro padrão foram calculados e analisados com análise de variância e comparados com o teste de Duncan. A probabilidade de $P < 0,05$ foi considerada significativa. Não houve influência da adição de 5 e 7,5 mM de LC sobre o percentual de espermatozoides com motilidade total (MT: $55,8 \pm 6,7$ e $46,1 \pm 6,6$ %) comparada ao controle ($51,3 \pm 4,1$ %, $P > 0,05$). No entanto, a concentração de 10 mM LC reduziu a MT ($24,6 \pm 4,0$ %) comparada aos outros tratamentos ($P < 0,05$). O ALH sofreu redução com 10 mM LC comparado ao controle ($3,1 \pm 0,2$ x $3,6 \pm 0,1$ μ m, $P < 0,05$), embora ambos não tenham diferido de 5 e 7,5 mM LC ($3,4 \pm 0,1$ e $3,3 \pm 0,1$ μ m, $P > 0,05$). A taxa de espermatozoides com MP íntegra não diferiu com adição de LC comparada ao controle ($39,2 \pm 4,5$ x $42,2 \pm 2,2$ %, $P > 0,05$). No entanto, a concentração de 10 mM LC aumentou o percentual de MP íntegra em relação a 7,5 mM LC ($47,9 \pm 3,8$ x $34,4 \pm 6,0$ %, $P < 0,05$). As outras variáveis não diferiram entre os tratamentos ($P > 0,05$). Em conclusão, o diluidor de sêmen TRIS modificado com 2% de gema de ovo preservou as características do espermatozoide congelado tão bem quanto com a adição de baixas concentrações de LC. Por outro lado, a LC em alta concentração foi prejudicial a motilidade espermática.

Palavras chaves: sêmen – criopreservação – cão - antioxidante - gema de ovo

Abstract

The request for artificial insemination with canine cryopreserved semen has increased. However, sperm quality and fertility are still lower than the cooled semen. During the freezing process, high proportion of seminal plasma is discarded to avoid *in vitro* sperm capacitation. Nonetheless, it increases sperm vulnerability to oxidative stress. Therefore, the addition of antioxidant substances to the canine sperm during semen freezing is of great interest to protect sperm against oxidative stress and increase their metabolism. This study aimed to enhance frozen canine semen quality with the addition of 5-, 7.5- and 10-mM L-carnitine (LC) to the TRIS frozen semen extender modified with 2% egg yolk. The frozen-thawed semen parameters were *in vitro* evaluated to sperm motility and kinematics, plasma membrane (PM) functionality and integrity, spontaneous acrosome reaction, lipid peroxidation, sperm morphology, hydrogenperoxide, nitrite and malonaldehyde semen concentration. The average and standard error were calculated and analyzed with analysis of variance and compared with Duncan test. The probability of $P < 0,05$ was considered significant. There was no influence of the addition of 5- and 7.5-mM LC on sperm total motility (TM: 55.8 ± 6.7 and $46.1 \pm 6.6\%$) compared to the control ($51.3 \pm 4.1\%$, $P > 0.05$). However, 10 mM LC decreased TM ($24.6 \pm 4.0\%$) compared to other treatments ($P < 0.05$). The ALH was reduced with 10 mM LC compared to that in the control ($3.1 \pm 0.2 \times 3,6 \pm 0,1 \mu\text{m}$, $P < 0.05$), eventhough both did not differ from 5- and 7.5-mM LC (3.4 ± 0.1 e $3.3 \pm 0.1 \mu\text{m}$, $P > 0,05$). The rate of sperm PM integrity did not differ with LC addition in comparison to the control (39.2 ± 4.5 vs. $42.2 \pm 2.2 \%$, $P > 0.05$). However, 10 mM LC increased the percentage PM integrity compared to that in 7.5 mM LC (47.9 ± 3.8 x $34.4 \pm 6.0\%$, $P < 0.05$). The other variables did not differ among the treatments ($P > 0,05$). In conclusion, the modified TRIS semen frozen extender with 2% egg yolk preserved the characteristics of the frozen sperm as well as with low LC concentrations. On the other hand, LC in high concentration was harmful to sperm motility.

Keywords: semen - cryopreservation - dog - antioxidant - egg yolk

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Desenho esquemático da morfologia espermática (Arquivo pessoal).....	16
Figura 2: Organização da membrana plasmática; modelo “mosaico fluido” (Singer e Nicolson, 1972).	17
Figura 3: Fórmula da L- carnitina (Hoppel, 2003).....	26
Figura 4: Mecanismo de ação da L-carnitina na célula (Hoppel, 2003).....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características espermáticas do sêmen fresco (n=7).	49
Tabela 2: Parâmetros espermáticos avaliados pelo CASA pós-descongelamento (média ± erro padrão).....	49
Tabela 3: Percentual de espermatozoides com membrana plasmática funcional e íntegras, e com reação acrossômica pós-descongelamento (média ± erro padrão).50	
Tabela 4: Concentrações de nitrito (NO_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de malonaldeído no sêmen pós-descongelamento (média± erro padrão).	50
Tabela 5: Percentual de espermatozoides morfolologicamente normais e com defeitos pós-descongelamento. (média ± erro padrão).....	51

SUMÁRIO

Resumo	9
Abstract	10
CAPÍTULO 1	15
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Morfologia espermática	17
2.1.2 Membrana espermática	18
2.2 Capacitação espermática	20
2.3. Criopreservação do sêmen canino	20
2.3.1 Diluidor de sêmen canino	22
2.4. Estresse oxidativo	22
2.4.1 Radical superóxido	23
2.4.2 Peróxido de hidrogênio	24
2.4.3 Radical hidroxila	24
2.4.4 Nitrito	24
2.5. Metabolismo do espermatozoide canino	25
2.6. L-Carnitina	27
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
CAPÍTULO 2	40
Artigo	Erro! Indicador não definido.
ABSTRACT	40
1 INTRODUÇÃO	41
2 MATERIAL E MÉTODOS	43
2.1 Coleta de sêmen	43
2.2 Avaliação do sêmen fresco	44
2.3 Congelamento do sêmen	44

2.4 Avaliação espermática pós-descongelamento	45
2.4.1 Análise da motilidade espermática computadorizada (CASA)	45
2.4.2 Avaliação da integridade de membrana plasmática e taxa de reação acrossômica espontânea	46
2.4.3 Avaliação da funcionalidade espermática	46
2.4.4 Peroxidação lipídica	47
2.4.5 Mensuração da concentração de nitrito (NO_2^-)	47
2.4.6 Mensuração da concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	48
2.4.7 Mensuração da concentração de malonaldeído.....	48
2.4.8 Morfologia espermática	49
2.5 Análise estatística	49
3 RESULTADOS	49
4 DISCUSSÃO	52
5 CONCLUSÃO.....	56
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
1. ANEXO I – Protocolo de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais	63

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

O uso de biotecnologias permite maior aproveitamento genético das espécies. Na cinofilia, tem sido frequente o intercâmbio mundial de material genético de cães de diversas raças entre criadores profissionais. Essa demanda mundial gera a necessidade de melhorar a qualidade do sêmen canino, principalmente por meio do uso de biotecnias como a criopreservação de sêmen.

Os métodos mais usados para preservação do sêmen canino são o resfriamento (Wittayarat et al., 2012) e congelamento (Futino et al., 2010). Contudo, há uma grande variação das taxas de fertilidade obtidas com a utilização do sêmen criopreservado. Essa condição está diretamente relacionada a perda de qualidade espermática após o congelamento e descongelamento (Schafer-Somi e Aurich, 2007).

O uso do sêmen canino congelado possibilita a manutenção do material genético de animais de grande interesse zootécnico por um período indeterminado, reduz o estresse animal provocado pelo transporte, pela mudança de clima e pelo tempo. Além disso, reduz o risco de transmissão de doenças e do desconforto pela inserção dos cães em ambientes desconhecidos (Linde-Forsberg e Forsberg, 1989).

Por outro lado, o sêmen de cão congelado/descongelado tem uma vida útil curta devido à perda da integridade das células espermáticas durante os processos de resfriamento, congelamento e descongelamento (Alhaider e Watson, 2009). Ressalta-se que no processo de criopreservação, os gametas podem passar por alterações estruturais e funcionais, como a ruptura das membranas plasmáticas e a fragmentação do DNA (Sieme et al., 2016).

Não existe um padrão ou protocolo ideal para o congelamento do sêmen canino, principalmente devido à grande variação individual. Foram descritas diferentes técnicas que variam quanto aos meios de preservação, seus agentes crioprotetores e protocolos de congelamento de sêmen (Eilts, 2005).

Durante o processo de congelamento de sêmen canino, este é centrifugado para que grande parte do plasma seminal seja descartado. Este procedimento, embora reduza a capacitação espermática *in vitro*, reduz a concentração de antioxidantes do sêmen presentes no plasma seminal (Srtzezek et al., 2009; Bunyaga e Kashoma, 2018). Por isso, a adição de antioxidantes tem sido preconizada para aumentar a viabilidade espermática da espécie.

O antioxidante L-carnitina (LC) está presente no trato genital masculino de mamíferos, especificamente no tecido epididimário, no plasma seminal e nos espermatozoides (Johansen e Bohmer, 1978). A LC é uma amina quaternária, polar e hidrofílica (Bieber, 1988). Ela age reduzindo a peroxidação lipídica e aumentando os níveis e a atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase e a glutational peroxidase (Neumam et al., 2002).

Depois de ejaculado, 90% da produção de ATP espermático passa a ser de substratos exógenos (Hammerstedt, 1983; Johnson et al., 2008). As carnitinas continuam atuando sobre as vias metabólicas mesmo quando durante a fertilização, o espermatozoide dependa diretamente da glicólise e da oxidação de lactato e piruvato provenientes do meio externo (Casillas e Erickson, 1975; Milkowsky et al., 1976; Huston et al., 1977).

A espécie canina apresenta índice variável de fertilidade com a inseminação artificial principalmente com sêmen criopreservado. Por isso, o desenvolvimento de alternativas para maximizar o sucesso da reprodução canina com sêmen congelado é de grande importância. A adição de antioxidantes e potenciadores da motilidade espermática a diluidores de sêmen pode ser uma opção para melhorar a qualidade do sêmen congelado canino.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Morfologia espermática

A primeira descrição de um espermatozóide canino foi feita por Leeuwenhoek, em 1678, mas somente no século XIX, com o surgimento da microscopia, foi possível a descrição morfológica dessa célula. A morfologia do espermatozoide canino é um dos parâmetros mais importantes durante a análise do sêmen, pois fornece informações importantes sobre a qualidade seminal (Oettlè, 1993; Tesi et al., 2018).

O espermatozoide é constituído de duas partes morfológicas e funcionalmente distintas: a cabeça e a cauda. A principal característica da cabeça é o núcleo achatado de forma oval, contendo cromatina altamente condensada (Hafez, 2004). Na extremidade da cabeça do espermatozóide tem-se o acrossoma, estrutura semelhante a uma capa que contém e secreta enzimas, como hialuronidase, acrosina, neuraminidase e fosfatase ácida (Chlopik e Wysokińska, 2020). A cauda do gameta masculino é composta de colo e peças intermediária, principal e terminal (Hafez, 2004). Em mamíferos, o axonema é um elemento básico que forma a cauda do espermatozoide, localizado na região central da cauda. Dessa forma, o axonema funciona como o núcleo da cauda do espermatozoide (Chlopik e Wysokińska, 2020), sendo responsável pela movimentação espermática. As mitocôndrias presentes na espermátide, durante a espermiogênese, se alinham em forma de hélice em volta da primeira parte da cauda, formando a “peça intermediária”. A porção da cauda que não é recoberta pelas mitocôndrias é denominada “peça principal” (Hafez, 2004). A peça terminal, posterior ao final da camada fibrosa, contém apenas o axonema central recoberto pela membrana plasmática (Fig. 1, Arquivo pessoal).

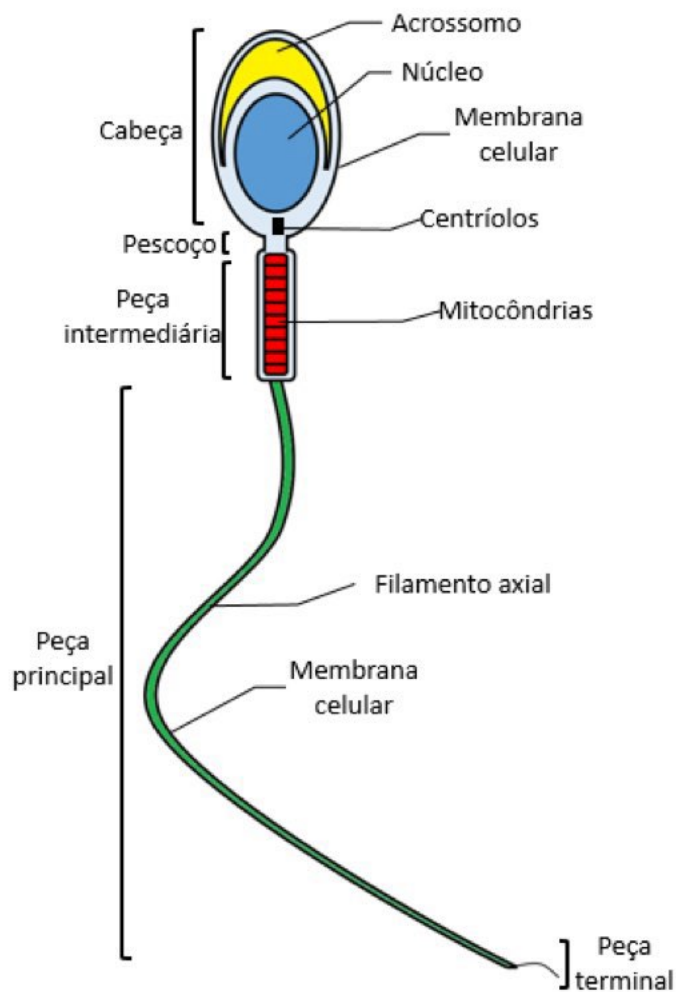


Figura 1: Desenho esquemático da morfologia espermática (Arquivo pessoal).

2.1.2 Membrana espermática

Nos espermatozoides, a membrana plasmática segue o modelo estrutural de bicamada fosfolipídica e proteínas associadas (Fig. 2, Watson, 1995). Ela também desempenha papel fundamental na fertilização, recebendo sinais e modificando-se ao longo do processo da espermatogênese, trânsito e armazenamento no epidídimo, ejaculação, ligação ao trato genital feminino e, capacitação e penetração do oócito (Cunha, 2002).

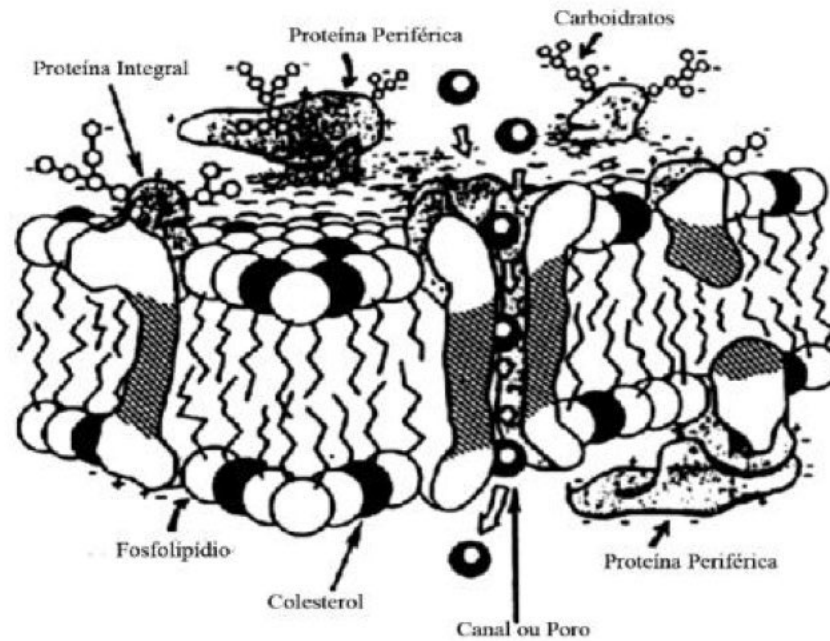


Figura 2: Organização da membrana plasmática; modelo “mosaico fluido” (Singer e Nicolson, 1972).

A membrana plasmática dos espermatozoides contém grandes quantidades de fosfolípidios e, em sua estrutura são encontrados colesterol e glicoproteínas (Chlopik e Wysokińska, 2020). A fluidez da membrana depende de alguns fatores, como temperatura, concentração de colesterol e o grau de saturação lipídica (Andrade et al, 2010). Os ácidos graxos saturados garantem maior rigidez, enquanto que os insaturados conferem maior fluidez a membrana (Andrade et al, 2010).

O colesterol reduz a mobilidade dos fosfolípidios presentes na bicamada que compõe as membranas, promovendo maior estabilidade (Watson, 1995). A membrana plasmática do espermatozóide canino apresenta uma baixa proporção de ácidos graxos poliinsaturados em relação aos ácidos graxos saturados (Bouchard et al., 1990). A presença de ligações duplas aumenta a reatividade química dos ácidos graxos, o que os tornam instáveis e susceptíveis a participarem de uma ampla variedade de reações químicas, podendo levar à perda de motilidade e danos à membrana (Lucio et al., 2017).

2.2 Capacitação espermática

Mudanças na estrutura da membrana plasmática do espermatozoide são necessárias para que ocorra a capacitação e fertilização (Keel e Webster, 1990). Os componentes da superfície dos espermatozoides são modificados ou removidos pelas secreções do trato genital, desestabilizando a bicamada fosfolipídica e permitindo a reação do acrossoma (Hafez, 2004). Após a capacitação observa-se um aumento da motilidade espermática, chamado de hiperativação espermática, caracterizada por um movimento da cauda semelhante à de um chicote com maior frequência e amplitude que a motilidade espermática não hiperativada (Cummins, 1983).

Para penetrar à zona pelúcida o espermatozoide sofre a reação acrossômica (Yanagimachi, 1994). Esse evento de exocitose é caracterizado por múltiplas fusões pontuais entre a membrana acrossômica externa e a membrana plasmática subjacente ao espermatozoide. Assim, ocorre liberação do conteúdo acrossômico e exposição da membrana acrossômica interna, fusão a membrana do oócito, e finalmente fertilização (Brewis e Moore, 1997).

2.3. Criopreservação do sêmen canino

A criopreservação é uma biotecnologia que permite o armazenamento de material genético por um tempo indefinido. Em 1954, foi descrita a primeira utilização de sêmen canino refrigerado através da inseminação artificial (IA), realizado por Harrop. A primeira gestação utilizando sêmen canino congelado foi noticiada em 1969 (Seager 1969), resultando no nascimento de dois filhotes. Atualmente, a criopreservação de sêmen é utilizada na espécie canina com o intuito de preservar a variabilidade genética por tempo indeterminado (Prapaiwan et al., 2016). No entanto, ocorre uma diminuição da qualidade espermática e da fertilidade (Cardoso et al., 2005).

Rota et al. (1995) demonstraram danos causados pelo plasma seminal na membrana plasmática dos espermatozoides caninos. Os autores sugeriram a adição de diluidores ao sêmen para aumentar a integridade de membrana espermática. O efeito deletério do plasma seminal canino à integridade de membrana foi relatado em outro estudo (England e Allen, 1992). Dessa forma, a centrifugação tem sido preconizada para

retirada do plasma seminal e padronização do volume e concentração de sêmen de cães (Lopes e Papa, 1998; Rijasseleare et al., 2002). No entanto, o descarte do plasma seminal pode remover fatores inibidores da capacitação e prostaglandinas (Carrell et al., 1998).

A maioria do sêmen de cães é estável à refrigeração e armazenamento até 48 horas a 4°C (Peña et al., 2006). No entanto, durante a criopreservação seminal, é necessário a redução de temperatura, desidratação e congelação espermática (Lucio et al., 2012). Este processo promove alterações estruturais e funcionais do espermatozoide, o que leva a redução da sua meia vida e capacidade fertilizante (Burgess et al., 2012).

Durante a queda de temperatura, os lipídios que compõem a membrana plasmática passam pela transição de fase, mudando progressivamente de uma fase líquido-cristalina para uma fase de gel (Hazel, 1995), reduzindo a resistência da membrana plasmática. A temperatura de gelificação de cada classe de fosfolipídios depende da relação entre o número de ligações simples e duplas (ou grau de saturação) entre os carbonos destas moléculas (Parks e Lynch, 1992). Dessa forma, as classes de fosfolipídeos gelificam em momentos diferentes de acordo com a temperatura e o tempo, o que provoca um rearranjo da membrana plasmática. Este pode ser prejudicial durante o reaquecimento levando a formação de poros na membrana e consequente perda de conteúdo celular.

England et al. (2012) demonstraram que ao diluir, resfriar e descongelar os espermatozoides de cães ocorre alterações semelhantes à capacitação, chamada de criocapacitação. Essas manipulações no sêmen canino reduziram significativamente a capacidade dos espermatozoides em se ligar a explantes epiteliais de tuba uterina (Burgess et al. 2012). A curva de resfriamento pode ser uma causa da criocapacitação precoce espermática. A queda de temperatura leva à alteração da permeabilidade da membrana e regulação do cálcio intracelular, podendo desencadear o processo de capacitação espermática e reação acrossômica (Barbas e Mascarenhas, 2009). Outra possibilidade pode ser a presença de constituintes desconhecidos presentes nos diluentes utilizados (Burgess et al. 2012).

2.3.1 Diluidor de congelamento de sêmen canino

Após a primeira inseminação artificial de cães com sêmen congelado com diluidor Tris (Andersen, 1975), a maioria dos pesquisadores tem utilizado este meio para a preservação do sêmen canino (Tsutsui et al., 2000; Iguer-Ouada e Verstegen, 2001). O meio TRIS é caracterizado por ação tampão, preservando a motilidade espermática (Teixeira et al., 2022).

Na composição do diluidor TRIS para congelamento de sêmen, além do glicerol, se usa rotineiramente a concentração de 20% de gema de ovo (Silva et al., 2002). A gema do ovo possui proteínas de alto valor biológico, ácidos graxos essenciais, fosfolipídios e glicerol de grande aplicação industrial e biomédica (Oliveira et al., 2021). Ela é um crioprotetor não penetrante a membrana espermática, devido as suas propriedades hidrofóbicas. Além disso, atua como um reservatório de colesterol e fosfolipídios que ajuda a proteger a membrana plasmática e acrossômica dos espermatozoides contra os danos criogênicos. As lipoproteínas de baixa densidade (LDL) da gema do ovo são responsáveis pela proteção dos espermatozoides ao choque térmico, preservação da motilidade e da integridade do DNA nuclear e das membranas espermáticas (Manjunath e Thérien, 2002; Moussa et al., 2002). Isso ocorre devido ao sequestro de proteínas capacitantes do plasma seminal pelas LDLs, reduzindo assim a capacitação espermática prematura *in vitro* (Manjunath e Thérien, 2002).

Por outro lado, a variação da composição da gema de ovo, o risco de transmissão de doenças e o crescimento bacteriano nos diluidores de sêmen tem incentivado pesquisas na área (Amirat-Briand et al., 2010; Anzar et al., 2019).

2.4. Estresse oxidativo

Todo o processo de criopreservação, como diluição, resfriamento, congelamento e descongelamento, pode levar a um estresse oxidativo, reduzindo a qualidade espermática e capacidade de fertilização na inseminação artificial (Lecewicz, 2018). Os principais fatores são a pouca reserva de antioxidante no citoplasma e a presença

de ácidos graxos poli-insaturados susceptíveis à peroxidação lipídica na membrana espermática (Vieira, 2018).

O estresse oxidativo ocorre quando a concentração de oxidantes ultrapassa a de antioxidantes (Aitken, 1994). Os termos radicais livres (RL), oxidantes e espécies reativas de oxigênio (EROs), são usados para identificar os intermediários químicos originários do metabolismo do oxigênio, ou seja, os subprodutos do metabolismo aeróbico (Maia et al., 2009). Em condições aeróbicas, a produção de EROs é um evento fisiológico, sendo que, estes metabólitos são essenciais para o funcionamento das células, geralmente atuando como gatilhos fisiológicos (Garrido et al., 2004). Normalmente a redução completa do oxigênio ocorre na mitocôndria, através de uma reação tetravalente aceitando quatro elétrons e formando água. Nessa condição, a reatividade das EROs é neutralizada pela entrada dos quatro elétrons (Nordberg e Arnér, 2001).

As EROs são encontradas 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). Provavelmente a presença de EROs está ligada às condições fisiológicas relacionadas aos processos de capacitação espermática, hiperativação, reação acrossômica e outros ainda não elucidados. Os espermatozoides possuem sistemas sensivelmente regulados para manter as EROs em concentrações basais, em que a produção e eliminação são precisamente balanceadas (Lushchak, 2014).

Os três principais tipos de EROs são radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) (Andrade et al., 2010).

2.4.1 Radical superóxido

O superóxido é um radical livre, formado a partir do oxigênio molecular pela adição de um elétron. Sua formação ocorre espontaneamente em quase todas as células aeróbicas, especialmente na membrana mitocondrial, por meio da cadeia respiratória. Não penetra as membranas lipídicas, agindo apenas na região onde é produzido (Nordberg e Arnér, 2001).

2.4.2 Peróxido de hidrogênio

A formação do peróxido de hidrogênio ocorre quando a molécula de oxigênio recebe somente dois elétrons ao invés de quatro, e com isso também é parcialmente reduzido como o radical superóxido (Gaté et al., 1999). O H_2O_2 não é um radical livre, mas um metabólito do oxigênio extremamente deletério, porque participa como intermediário na reação que produz o $OH^\bullet$ (Andrade et al., 2010).

2.4.3 Radical hidroxila

É considerado o radical livre mais reativo em sistemas biológicos, sendo capaz de causar mais danos do que qualquer outra ERO. (Andrade et al., 2010). O radical hidroxila é gerado através da Reação de Fenton, a partir do H_2O_2 em excesso, que é catalisado por metais de transição, como por exemplo, ferro e cobre (Maia et al., 2009). Molécula altamente reativa em sistemas biológicos, e reage rápido com estruturas que estão próximas, atacando moléculas orgânicas pela abstração de hidrogênio (Nordeberg e Arnér, 2001).

2.4.4 Nitrito

O óxido nítrico (NO) tem função importante na fisiologia espermática (Aitken e Fisher, 1994). É uma molécula altamente reativa, de vida curta e lipofílica, com uma meia-vida de apenas alguns segundos, o que dificulta a quantificação (Ignarro et al., 1989). Dessa forma, seus metabólitos, nitrito (NO_2^-) e nitrato, são mais estudados. A formação de NO_2^- endógeno deriva tanto da oxidação de NO, como de fontes dietéticas (Bryan et al., 2007; Dejam et al., 2005). Estudos demonstraram a relação da presença de NO com a redução de ATP (Weinberg et al. 1995), e outros correlacionaram negativamente os níveis de nitrato com motilidade espermática (Ghavamzadeh et al., 2011).

2.5. Metabolismo do espermatozoide canino

A produção de energia espermática, através da produção de ATP, pode ocorrer pela glicólise e fosforilação oxidativa ou ambas as vias (Chlopik e Wysokińska, 2020).

A glicólise ocorre na cabeça e peça principal do flagelo (Du Plessis et al. 2015). Ela tem como resultado final a formação de piruvato, que em condições anaeróbias é reduzido a lactato e em condições aeróbicas a acetil-CoA, a qual será incluída ao ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs) (Chlopik e Wysokińska, 2020). No espermatozoide de mamíferos, as enzimas glicolíticas, como a hexoquinase, fosfoglucoquinase isomerase, fosfofrutoquinase, lactato desidrogenase (LDH) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Kim et al., 2007) estão concentradas na peça principal, e algumas estão ligadas à bainha fibrosa do flagelo (Eddy et al., 2003). O ATP produzido nesse processo já se encontra adjacente ao local necessário para suportar o deslizamento ativo dos filamentos flagelares (Ford, 2006).

A fosforilação oxidativa ocorre nas mitocôndrias, concentradas na peça intermediária e envolve a cadeia respiratória e a ATP sintase (Piomboni et al., 2012; Du Plessis et al. 2015). As mitocôndrias espermáticas possuem isoformas específicas de proteínas e isoenzimas, como a citocromo C (Narisawa et al., 2002), hexoquinase subunidade VIb da citocromo C oxidase (Huttemann et al., 2003) e a LDH (Blanco e Zinkham, 1963; Storey, 2008).

A produção de energia via captação de monossacarídeos para o interior do espermatozoide ocorre basicamente pela difusão facilitada (independente de Na^+), e pelo cotransporte de monossacarídeo- Na^+ (Marzzoco e Torres, 1999).

A difusão facilitada é exercida por diferentes membros de uma família de proteínas transportadoras chamadas de GLUTs (transportadoras de glicose). As receptoras de glicose (GLUTs) localizadas na membrana plasmática dos espermatozoides caninos têm sua atividade relacionada ao metabolismo espermático (Gawlik et al., 2008) e à plasticidade metabólica (Fernández-Novell et al., 2004; Rigau et al., 2001, 2002). Em espermatozoides caninos foram identificadas a presença de GLUT-1,2,3,4 e 5, sendo que a GLUT 3 e 5 capturam frutose (Rigau et al., 2002; Bucci et al., 2011). A GLUT 5

está localizada ao redor do acrossoma, enquanto a GLUT 3, está localizado na cauda, principalmente na peça intermediária (Rigau et al., 2002). Em espermatozoides caninos, as GLUTs 3 e 5 sofrem realocação após incubação sob condições de capacitação (Bucci et al., 2010). Isso ocorre devido a um aumento da taxa metabólica espermática induzindo a uma modificação da localização das GLUTs (Bucci et al., 2022).

O sistema de cotransporte de Na^+ tem menor demanda quando comparado às GLUTs (Gibb e Aitken, 2016). Este sistema foi identificado na região periacrossômica e na peça intermediária do espermatozoide canino, levando a hipótese de que a via metabólica usada depende da maior afinidade pelo substrato (Rigau et al., 2002).

O plasma seminal canino não contém quantidades significativas de glicose, frutose, sorbitol ou manose (Rigau et al., 2001). Entretanto, a frutose aumenta mais o metabolismo espermático de cães que a glicose quando em baixas concentrações (de 0,1 a 1mM, Rigau et al., 2002). Embora, os espermatozoides caninos apresentem maior afinidade pela frutose do que pela glicose, em concentrações acima de 5mM não foi observada preferência do uso entre esses monossacarídeos (Fernández-Novelle et al., 2004; Agius 2008). Em contraste, a capacitação espermática canina *in vitro* ocorre na ausência de qualquer monossacarídeo, embora envolva a ativação da síntese de glicogênio (Albarracín et al., 2004a, 2004b). Esses resultados sugerem que os monossacarídeos podem desenvolver atividades moduladoras de funções espermáticas específicas (Fernández-Novell et al., 2011). Como exemplo, é o controle da atividade de uma variedade de proteínas quinases e fosfatases e outras proteínas reguladoras do espermatozoide, como as ciclinas (Furuya et al., 1992; Breitbart e Naor 1999).

No espermatozoide canino foi encontrada uma proteína de mamíferos com características imunológicas e cinéticas semelhantes às da glucoquinase hepática (GK) (Fernández-Novelle et al., 2004). Essa proteína tem como papel principal atuar como interruptor metabólico, indicando a todo o organismo qual seria o destino dos açúcares circulantes (Magnuson e Matschinsky, 2004). Dessa forma, a presença de uma proteína com atividade semelhante à da GK no espermatozoide canino, pode indicar a presença de um sistema de escolha do açúcar extracelular a ser utilizado

para funções específicas além da produção de energia espermática (Rodríguez-Gil e Bonet, 2016).

Além disso, os espermatozoides caninos são células rápidas e com grande capacidade de sobrevivência no trato genital feminino (Doak et al., 1967; Tsutsui, 1989). Características necessárias, já que a cadela possui estro de longa duração (até 9 dias) e nem sempre tem a receptividade sexual sincronizada com a ovulação (até 11 dias da ejaculação à fertilização) (Foutouhi e Meyers, 2022). Dessa forma, o espermatozoide canino para se manter vivo e funcional por longos períodos desenvolveu diferentes estratégias metabólicas, como alta capacidade de metabolizar glicose (Fernández-Novell et al., 2004), plasticidade metabólica (Bucci et al., 2010a; Rigau et al., 2001, 2002) e usar glicogênio para funções de alta demanda energética (Albarracín et al., 2004a). O elevado tempo de sobrevivência no trato genital feminino (mais de 10 dias) e a rapidez dos espermatozoides caninos (Bucci et al., 2022) estão relacionados a capacidade de ativar vias anabólicas de síntese de glicogênio (Ballester et al., 2000). A exceção do espermatozoide de outras espécies de mamíferos, o espermatozoide canino tem uma via de gliconeogênese, a qual usa o lactato extracelular para formação de estoques de glicogênio intracelular para a capacitação *in vitro*, (Albarracín et al., 2004a). A energia necessária para o estoque interno de glicogênio do espermatozoide canino é obtida pela degradação dos depósitos de glicogênio em glicose, que é utilizada para a glicólise e, eventualmente, na fosforilação oxidativa mitocondrial (Rodríguez-Gil e Bonet, 2016).

2.6. L-Carnitina

A L-carnitina (LC) foi descoberta em 1905 como constituinte de tecido muscular (Gulewitsch, 1905; Kutscher, 1905), e está presente em maiores concentrações no trato genital masculino de mamíferos, especificamente no tecido epididimário, plasma seminal e espermatozoides (Bohmer et al., 1978). Nos espermatozoides caninos a LC se encontra em altas concentrações no plasma seminal (Farstad, 2009). O epidídimo é a principal fonte de carnitina no fluido seminal canino (Olson et al. 1987) que desempenha um papel importante na estabilização da membrana mitocondrial, no aumento do suprimento de energia das organelas e na proteção às células da morte celular apoptótica (Pillich et al. 2005).

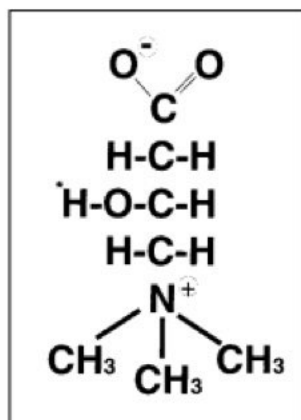


Figura 3: Fórmula da L- carnitina (Harmeyer, 2002)

A LC é uma substância altamente solúvel em água, tem boa termoestabilidade (até 200 °C), baixa toxicidade e denominada β-hidroxi-γ-trimetil-aminobutirato (Fig. 2, Harmeyer, 2002). Ela é sintetizada por células vegetais e animais, além de ter sido encontrada também em fungos e bactérias (Kleber, 1997). A LC é considerada um composto vitamínico sintetizado no fígado, rins e cérebro importante na conversão dos aminoácidos lisina e metionina (Hoppel, 2003).

A LC é um cofator essencial para a β-oxidação, que leva à produção de energia a partir de lipídios na mitocôndria (Yan et al., 2017). Atua como facilitadora do transporte de ácidos graxos para a membrana interna da mitocôndria facilitando o processo de β-oxidação com consequente aumento da produção energética pela célula (Fritz, 1962; Hoppel, 2003; Fig. 4). Ela também possui atividades anti-apoptóticas e antioxidantes, pode inibir a peroxidação lipídica e proteger a membrana espermática de mamíferos (Gülçin, 2006; Yan et al., 2017), atuando na proteção da estrutura do DNA contra as espécies reativas ao oxigênio (EROS, Qi et al., 2006).

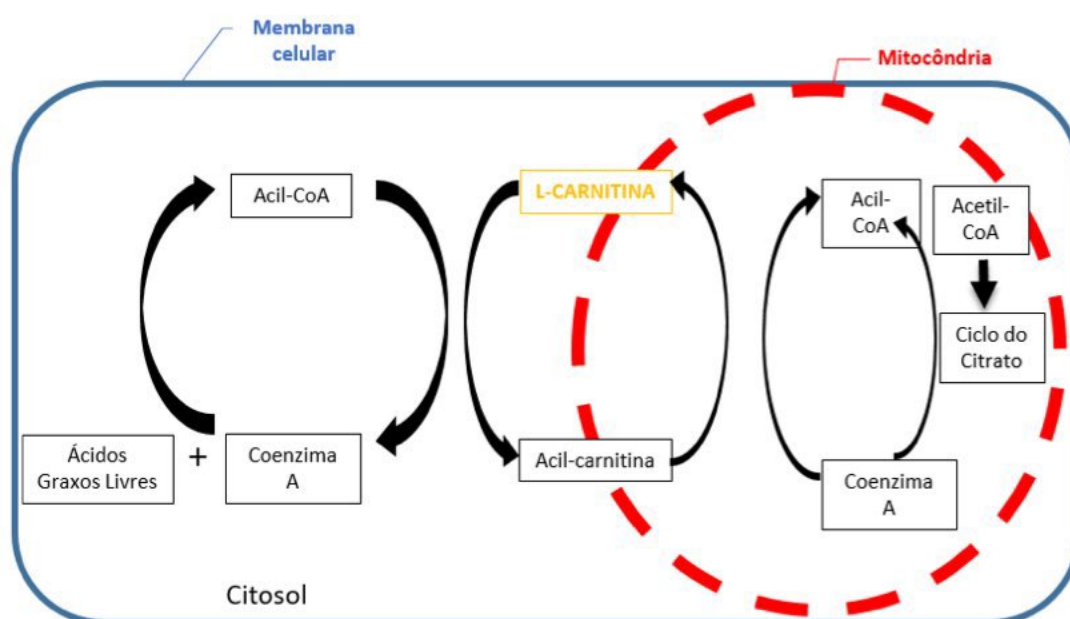


Figura 4: Mecanismo de ação da L-carnitina na célula (adaptado de Hoppel, 2003).

A LC é um antioxidante natural barato e livre de efeitos colaterais, demonstrado em ensaios com humanos a partir da administração oral (DiNicolantonio et al., 2019). Ela é capaz de aumentar o nível e a atividade de enzimas antioxidantes como a glutathione peroxidase e a superóxido dismutase (Neuman et al., 2002). O papel principal da LC é facilitar o transporte de acil-CoA graxo exógeno através da matriz mitocondrial (Brooks, 1979). A formação de Acil-Carnitina (AC) atua como fonte de energia prontamente oxidável para a respiração. Esta também atua como um tampão para o transporte de acetil-CoA (Solarska et al., 2010) contribuindo para a manutenção de processos metabólicos, como a motilidade.

Devido a demanda crescente da inseminação artificial com sêmen criopreservado, o presente estudo teve como objetivo aumentar a qualidade espermática do sêmen congelado canino com adição de L-carnitina (LC) ao diluidor de congelamento de sêmen modificado. A qualidade do sêmen foi avaliada *in vitro* quanto a motilidade e cinemática espermática, funcionalidade e integridade de membrana plasmática, reação acrossômica espontânea, morfologia espermática, nível de peroxidação lipídica, e mensuração da concentração de H_2O_2 , NO_2^- e malonaldeído pós-congelamento- descongelamento.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGIUS, L. Glucokinase and molecular aspects of hepatic glycogen metabolism. *Biochemical Journal*, v. 414, p. 1-18, 2008.

AITKEN, J.; FISHER, H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays*, v. 16, n. 4, p. 259-267, 1994.

AITKEN, R. J. A free radical theory of male infertility. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 6, n. 1, p. 19-23, 1994.

ALBARRACÍN, J. L.; FERNANDEZ-NOVELL, J. M.; BALLESTER, J et al. Gluconeogenesis-linked glycogen metabolism is important in the achievement of in vitro capacitation of dog spermatozoa in a medium without glucose. *Biology of Reproduction*, v. 71, p. 1437-1445, 2004a.

ALBARRACÍN, J. L.; MOGAS, T.; PALOMO, M. J. et al. In vitro capacitation and acrosome reaction of dog spermatozoa can be feasibly attained in a defined medium without glucose. *Reprod Domest Anim*, v. 39, p. 129-135, 2004b.

Alhaider AK, Watson PF. Cryopreservation of canine semen: the effects of Equex STM paste on plasma membrane fluidity and the control of intracellular free calcium. *Anim Reprod Sci*. v. 110, n. 1-2, p. 147-161, 2009.

AMIRAT-BRIAND, L.; BENCHARIF, D.; VERA-MUNOZ, O. et al. In vivo fertility of bull semen following cryopreservation with an LDL (low-density lipoprotein) extender: Preliminary results of artificial inseminations. *Animal Reproduction Science*, v. 122, n. 3-4, p. 282-287, 2010.

ANDERSEN, K. Insemination of frozen dog semen based on a new insemination technique. *Zuchthygiene*, v. 10, p. 1-4, 1975.

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

ANZAR, M.; RAJAPAKSHA, K.; BOSWALL, L. Egg yolk-free cryopreservation of bull semen. *PLoS One*, v. 14, n. 10, p. e0223977, 2019.

BALLESTER, J.; FERNANDEZ-NOVELL, J. M.; RUTTLANT, J. et al. Evidence for a functional glycogen metabolism in mature mammalian spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, v. 56, p. 207-219, 2000.

BARBAS, J.; MASCARENHAS, R. Cryopreservation of domestic animal sperm cells. *Cell and Tissue Banking*, v. 10, n. 1, p. 49-62, 2009.

BIEBER, L. L. Carnitine. *Annu Rev Biochem*. v. 57, p. 261-283, 1988.

- BLANCO, A.; ZINKHAM, W. H. Lactate dehydrogenases in human testes. *Science*, v. 139, p. 601-602, 1963.
- BOHMER, T.; HOEL, P.; PURVIS, K. et al. Carnitine levels in human accessory sex organs. *Archives of Andrology*, v. 1, n. 1, p. 53-59, 1978.
- BOUCHARD, G. F.; MORRIS, J. K.; SIKES, J. D. et al. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoa motility. *Theriogenology*, v. 34, p. 147-157, 1990.
- BREITBART, H.; NAOR, Z. Protein kinase in mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. *Rev. Reprod.*, v. 4, p. 151-159, 1999.
- BREMER, J. Carnitine--metabolism and functions. *Physiol Ver*, v. 63, p. 1420-1480, 1983.
- BREWIS, I. A.; MOORE, H. D. M. Mecanismos moleculares de gameta reconhecimento e fusão na fertilização. *Hum Reprod*, v. 12, Natl Supl 2, p. 156-165, 1997.
- BROOKS, D. E. Carnitine, Acetylcarnitine and the Activity of Carnitine Acyltransferases in Seminal Plasma and Spermatozoa of Men, Rams and Rats. *Reproduction*, v. 56, p. 667-673, 1979.
- BRYAN, N. S.; CALVERT, J. W.; ELROD, S. et al. Dietary nitrite supplementation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*;10448, p.19144–19149, 2007.
- BUCCI, D.; ISANI, G.; SPINACI, M. et al. Comparative Immunolocalization of GLUTs 1, 2, 3 and 5 in boar, stallion and dog Spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.*, v. 45, p. 315-322, 2010.
- BUCCI, D.; RODRIGUEZ-GIL, J. E.; VALLORANI, C. et al. GLUTs and Sperm Metabolism in Mammals. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 32, p. 348-355, 2011.
- BUCCI, D.; SPINACI, M.; BUSTAMANTE-FILHO, I. C. et al. Sperm mitochondria: clues and challenges. *Anime Playback*, v. 19, n. 4, e20220131, 2022.
- BUNYAGA, A. S.; KASHOMA, I. P. et al. Cryopreservation of dog semen as an alternative method to improved fertility in bitches: A review article. *Manakin*, p. 216-227, 2018.
- BURGESS, C. M.; CLUTTERBUCK, A. L.; ENGLAND, G. C. W. The effect of cryopreservation on the capacitation status and epithelial cell attachment capability of dog spermatozoa. *Vet J*, v. 192, n. 3, p. 398-402, 2012.
- CARDOSO, R. C. S.; SILVA, A. R.; SILVA, L. D. M. Métodos de avaliação do sêmen canino congelado. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v. 29, n. 3/4, p. 179-187, 2005.

CARRELL, D.T.; KUNECK, P.H.; PETERSON, C.M. et al. A randomized, prospective analysis of five sperm preparation techniques before intrauterine insemination of husband sperm. *Fertil. Steril.*, v.69, p.122-126, 1998.

CASILLAS, E. R.; ERICKSON, B. J. The role of carnitine in spermatozoan metabolism: substrate-induced elevations in the acetylation state of carnitine and coenzyme A in bovine and monkey spermatozoa. *Biol. Reprod.*, v. 12, p. 275-283, 1975.

CHLOPIK, A.; WYSOKINSKA, A. Canine spermatozoa—What do we know about their morphology and physiology? An overview. *Reprod. Domest. Anim.*, v. 55, p. 113-126, 2020.

CONCANNON, P. W.; BATTISTA, M. Canine semen freezing and artificial insemination. In: KIRK, R. W. (Ed), *Current Veterinary Therapy, Small Animal Practice*, X. W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 1247-1259, 1989.

CUMMINS, J. M. Sperm size, body mass and reproduction in mammals. In: *The Sperm Cell*, pp. 395-398. Ed. J. André. Martinus Nijhoff, The Hague, 1983.

CUNHA, I. C. N. Criopreservação do sêmen de cães. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 144f, 2002.

DEJAM, A.; HUNTER, M. M.; PELLETIER, L. L. et al. Erythrocytes are the major intravascular storage sites of nitrite in human blood. *Blood*, v. 106, n. 2, p. 734-739, 2005.

DINICOLANTONIO, J. J.; MCCARTY, M.; OKEEFE, J. Association of moderately elevated trimethylamine N-oxide with cardiovascular risk: Is TMAO serving as a marker for hepatic insulin resistance. *Open Heart*, v. 6, p. e000890, 2019.

DOAK, R. L.; HALL, A.; DALE, H. E. Longevity of spermatozoa in the reproductive tract of the bitch. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 13, p. 51-58, 1967.

DU PLESSIS, S. S.; AGARWAL, A.; MOHANTY, G. et al. Oxidative phosphorylation versus glycolysis: What fuel do spermatozoa use? *Asian J. Androl.*, v. 17, p. 230-235, 2015.

EDDY, E. M.; TOSHIMORI, K.; O'BRIEN, D. A. Fibrous sheath of mammalian spermatozoa. *Microsc Res Tech*, v. 61, p. 103-115, 2003.

EILTS, B. E. Theoretical aspects of canine cryopreserved semen evaluation. *Theriogenology*, v. 64, p. 685-691, 2005.

ENGLAND, G. C. W.; ALLEN, W. E. Factors affecting the viability of canine spermatozoa II: Effects of seminal plasma and blood. *Theriogenology*, v. 37, p. 373-381, 1992.

- ENGLAND, G. C. W.; BURGESS, C. M.; FREEMAN, S. L. Relationship between sperm-epithelial interaction and mating-induced endometritis in bitches. *Vet J*, v. 194, p. 314-318, 2012.
- ENGLAND, G. C. W.; PLUMMER, J. M. Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, v. 47, p. 261-270, 1993.
- FARSTAD, W. Cryopreservation of canine semen – new challenges. *Reprod Domest Anim*, v. 44, p. 336-341, 2009.
- FERNÁNDEZ-NOVELL, J. M.; BALLESTER, J.; ALTIRRIBA, J. et al. Glucose and fructose as functional modulators of overall dog, but not boar sperm function. *Reprod. Fertil. Dev.*, v. 23, p. 468-480, 2011.
- FERNÁNDEZ-NOVELL, J. M.; BALLESTER, J.; MEDRANO, A. et al. The presence of a high-Km hexokinase activity in dog, but not in boar, sperm. *FEBS Letters*. V. 570, p. 211-216, 2004.
- FORD, W. C. Glycolysis and sperm motility: Does a spoonful of sugar help the flagellum go round? *Hum. Reprod. Update*, v. 12, p. 269-274, 2006.
- FOUTOUHI, A.; MEYERS, S. Comparative oxidative metabolism in mammalian sperm. *Anim Reprod Sci*, v. 247, p. 107095, 2022.
- FRITZ, L.B. *Adv. Lipid. Res.*, v. 1, p. 285-334, 1962.
- FURUYA, S.; ENDO, Y.; OBA, M. et al. Effects of protein kinase and phosphatase modulators on sperm capacitation in mice. *J. Assist. Playback Genet.*, v. 9, p. 391-399, 1992.
- FUTINO, D.; MENDES, M.; MATOS, W. et al. Glycerol, methyl-formamide and dimethylformamide in canine semen cryopreservation. *Reprod Domest Anim*, v. 45, p. 214-220, 2010.
- GARRIDO, N.; MESEGUER, M.; SIMON, C. et al. Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation to male fertility. *Asian Journal of Andrology*, v. 6, n. 1, p. 59-65, 2004.
- GATÉ, L.; PAUL, J.; NGUYEN BAC, T. et al. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed Pharmac*, v. 53, p. 169-180, 1999.
- GAWLIK, V.; SCHMIDT, S.; SCHEEPERS, A. et al. Targeted disruption of Slc2a8 (GLUT8) reduces motility and mitochondrial potential of spermatozoa. *Mol. Membr. Biol.*, v. 25, p. 224-235, 2008.
- GHAVAMZADEH, A.; ALIMOGHADDAM, K.; ROSTAMI, S. et al. Phase II study of single-agent arsenic trioxide for the front-line therapy of acute promyelocytic leukemia. *J. Clin. Oncol.*, v. 29, p. 2753-2757, 2011.

GIBB, Z.; AITKEN, R. J. The Impact of Sperm Metabolism during In Vitro Storage: The Stallion as a Model. *Biomed Res Int.*, e9380609, 2016.

GÜLÇİN, I. Antioxidant and antiradical activities of L-Carnitine. *Life Sci*, v. 78, p. 803-811, 2006.

GULEWITSCH, W. Zur Kenntnis der Extraktionsstoffe der Muskeln. 2. Mitteilungen über das Carnitin [Extracted substances in muscle, report on carnitine]. *Hoppe-Seyler Z. Physiol. Chem.*, v. 45, p. 326-330, 1905.

HAFEZ, E. S. E. Preservação e criopreservação de gametas e embriões. In: *Reprodução Animal*. 7. ed. São Paulo: Manole, Cap. 24, p. 513-535, 2004.

HAMMERSTEDT, R. H. Use of sperm as a model for the study of metabolism. In: LENNON, D.F., STRATMAN, F.W., ZAHLTEN, R.N. (eds.), *Biochemistry of Metabolic Processes*. New York: Elsevier, p. 29-40, 1983.

HARMEYER, J. The physiological role of L-carnitine. *Lohmann Inf.*, v. 27, p. 15-21, 2002.

HARROP, A. E. Artificial insemination in a bitch with preserved semen. *Br Vet J*, v. 110, p. 424-425, 1954.

HAZEL, J. Thermal Adaptations in Biological Membranes: Is Homeoviscous Adaptation the Explanation? *Annu. Rev. Physiol.*, v. 57, p. 19-42, 1995.

HOPPEL, C. The Role of Carnitine in Normal and Altered Fatty Acid Metabolism. *Am. J. Kidney Dis.*, v. 41, 2003.

HUSTON, S. M.; VAN DOP, C.; LARDY, H.A. Mitochondrial metabolism of pyruvate in bovine spermatozoa. *J. Biol. Chem.*, v. 252, p. 1309-1315, 1977.

HUTTEMANN, M.; JARADAT, S.; GROSSMAN, L.I. Mammalian cytochrome c oxidase contains a testicular-specific isoform of subunit VIb – The counterpart of cytochrome c? *Mol. Cell Dev.*, v. 66, p. 8-16, 2003.

IGNARRO, L. J.; GOLD, M. E.; BUGA, G. M. et al. Basic polyamino acids rich in arginine, lysine, or ornithine cause both enhancement of and refractoriness to formation of endothelium-derived nitric oxide in pulmonary artery and vein. *Circ Res*. v. 64, p. 315–329, 1989.

IGUER-OUADA, M.; VERSTEGEN, J. P. Long-term preservation of chilled canine semen: effect of commercial and laboratory prepared extenders. *Theriogenology*. V. 55, p. 671–684, 2001.

JOHANSEN, L.; BOHMER, T. Carnitine-Binding Related Suppressed Oxygen Uptake by Spermatozoa. *Archives of Andrology*. v. 1, p. 321–324, 1978.

JOHNSON, L., THOMPSON JR, D. L.; VARNER, D. D. Role of Sertoli cell number and function on regulation of spermatogenesis. *Anim Reprod Sci.* v. 105, p. 23-51, 2008.

KEEL, B. K.; WEBSTER, B. W. Handbook of the laboratory diagnosis and treatment of infertility. *CRC Press.* P. 80-96, 1990.

KIM, Y. H.; HAIDL, G.; SCHAEFER, M. et al. Compartmentalization of a single ADP/ATP transporter protein SFEC (Sperm Flagellar Energy Carrier, AAC4) with glycolytic enzymes in the fibrous sheath of the flagellar head piece of human sperm. *Dev Biol.*;v. 302, p. 463–476, 2007.

KLEBER, H. P. Bacterial carnitine metabolism. *FEMS Microbiol. Lett.* v. 147, p. 1-9, 1997.

KUTSCHER, F. Z.; Untersuch. Nuhr. Genussm. IO, 528, 1905.

LECEWICZ, M.; STRZEZEK, R.; KORDAN, W. et al. Effect of extender supplementation with low molecular weight antioxidants on selected quality parameters of cryopreserved canine spermatozoa. *Journal of Veterinary Research.* v.62, n.2, p.221-227, 2018.

LEEUEWENHOEK, A. Observationes D. Anthonii Lewenhoeck, de Natis e semine genitali Animalculis. *Philosophical Transactions.* v.12, p.1040–1043, 1678.

LINDE-FORSBERG, C.; FORSBERG, M. Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, v. 39, p. 299–310, 1989.

LOPES, M. D.; PAPA, F. O. Effects of different diluents and method of centrifugation for freeze canine semen. In: *CONGRESS OF THE WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION*, 23. Buenos Aires, p.799, 1998.

LUCIO, A.; RESENDE, M.; DERNOWSECK-MEIRELLES, J. et al. Assessment of swim-up and discontinuous density gradient in sperm sex preselection for bovine embryo production. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 64, p. 525–532, 2012.

LUCIO, C. F.; BRITO, M. M.; ANGRIMANI, D. S. R. et al. Composição lipídica da membrana plasmática de espermatozoides caninos como marcadores de motilidade espermática. *Reprodução em animais domésticos*, v. 52, p. 208–213, 2017.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem. Biol. Interact.*, v. 224, p. 164–175, 2014.

MAGNUSON, M. A.; MATSCHINSKY, F. M. Glucokinase as a glucose sensor: past, present and future. In: MAGNUSON, MA, MATSCHINSKY, FM, editors. Glucokinase and glycemic disease: from basics to new therapeutics. *Front diabetes*, v. 16, p.1–17, 2004.

MAIA, M. S.; BICUDO, S. D.; AZEVEDO, H. C. et al. Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. *Small Ruminant Research*, v. 85, n. 2-3, p. 85–90, 2009.

MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol.*, v. 53, p.109–119, 2002.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. Bioquímica Básica. 2ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

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

MILKOWSKI, A. L.; BABCOCK, D. F.; LARDY, H. A. Activation of bovine epididymal sperm respiration by caffeine: its transient nature and relationship to utilization of acetylcarnitine. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 176, p. 250–256, 1976.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A. et al. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen–thawed bull semen. *Theriogenology*, v. 57, p. 1695–1706, 2002.

NARISAWA, S.; HECHT, N. B.; GOLDBERG, E. et al. Null mice with testis-specific cytochrome c produce functional sperm but suffer early testicular atrophy. *Mol Cell Biol.*, v. 22, p. 5554–5562, 2002.

NEUMAN, S. L.; LIN, T. L.; HESTE, P. Y. The effect of dietary carnitine on semen traits of white Leghorn roosters. *Poult. Sci.*, v. 81, p. 495–503, 2002.

NORDEBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants and the mammalian thioredoxin system. *Free Radicals in Biology and Medicine*, v. 31, n. 11, p. 1287–1312, 2001.

OETTLÉ, E. E. Sperm morphology and fertility in the dog. *Journal of Reproduction & Fertility Supplement*, v.47, p. 257–260, 1993.

OLIVEIRA, L. L. N.; AGUIAR, Q. H. S. L.; LIMA, F. S. et al. Refrigeração de sêmen canino com diluente a base de leite e gema de ovo 2%. *Medicina Veterinária (UFRPE)*, v. 15, n. 3, p. 270–275, 2021.

OLSON, A. L.; REBOUCHE, C. J. Butyrobetaine hydroxylase activity is not rate limiting for carnitine biosynthesis in the human infant. *J. Nutr.*, v. 117, p. 1024–1031, 1987.

PARKS, J. E.; LYNCH, D. V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, v. 29, p. 255–266, 1992.

PEÑA, F. J.; NÚÑEZ-MARTÍNEZ, I.; MORÁN, J. M. Semen technologies in dog breeding: an update. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 41, p.21–29, 2006.

PILLICH, R.T.; SCARSELLA, G.; RISULEO, G. Reduction of apoptosis through the mitochondrial pathway by the administration of acetyl-L-carnitine to mouse fibroblasts in culture. *Exp Cell Res*, v. 306, p.1-8, 2005.

PIOMBONI, P.; FOCARELLI, R.; STENDARDI, A. et al. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. *Int J Androl*, v. 35, p. 109–124, 2012.

PRAPAIWAN, N.; THARASANIT, T.; PUNJACHAIPORNPOL, S. et al. Lowdensity lipoprotein improves motility and plasma membrane integrity of cryopreserved canine epididymal spermatozoa. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, v. 29, p. 646–651, 2016.

QI, S. N.; ZHANG, Z. F.; WANG, Z. Y. et al. L-carnitine inhibits apoptotic DNA fragmentation induced by a new spin-labeled derivative of podophyllotoxin via caspase-3 in Raji cells. *Oncol Rep*, v. 15, p. 119-122, 2006.

RIGAU, T.; FARRÈ, M.; BALLESTER, J. et al. Effects of glucose and fructose on mobility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Theriogenology*, v. 56, p. 801-815, 2001.

RIGAU, T.; RIVERA, M.; PALOMO, M. J. et al. Differential effects of glucose and fructose on hexose metabolism in dog spermatozoa. *Reproduction*, v. 123, n. 4, p. 579-591, 2002.

RIJASSELAERE, T.; VAN SOOM, A.; MAES, D. et al. Effect of centrifugation on in vitro survival of fresh diluted spermatozoa. *Theriogenology*, v. 57, p.1669-1681, 2002.

RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; BONET, S. Current knowledge on boar sperm metabolism: comparison with other mammalian species. *Theriogenology*, v. 85, p. 4–11, 2016.

ROTA, A.; STROM, B.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4° C. *Theriogenology*, v. 44, p. 885-900, 1995.

SCHÄFER-SOMI, S.; AURICH, C. Use of a new computer-assisted sperm analyzer for the assessment of motility and viability of dog spermatozoa and evaluation of four different semen extenders for predilution. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 102, p. 1-13, 2007.

SEAGER, S. W. J. Successful pregnancies utilizing frozen dog semen. *A.I. Digest*, v. 17, p. 6-7, 1969.

SIEME, H., OLDENHOF, H., WOLKERS, W. F. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. *Anim Reprod Sci.*, v. 169, n. 2-5, 2016.

SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S.; UCHOA, D. C et al. Effect of Tris-Buffer, Egg Yolk and Glycerol on Canine Semen Freezing. *The Veterinary Journal*, v. 164, p. 244-246, 2002.

SILVA, L. D. M.; VERSTEGEN, J. P. Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*, v. 44, p. 571-579, 1995.

SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, v. 175; p. 720-731, 1972.

SOLARSKA, K.; LEWIŃSKA, A.; KAROWICZ-BILIŃSKA, A. et al. The antioxidant properties of carnitine in vitro. *Cell. Mol. Biol. Lett.* v. 15, 2010.

SRTZEZEK, R.; KOZIOROWSKA-GILUN, M.; KOWALÓWKA, J. et al. Characteristics of antioxidant system in dog semen. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, v. 12, n. 1, p. 55-60, 2009.

STOREY, B.T. Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe. *The International Journal of Developmental Biology*, v. 52, p. 427-437, 2008.

TEIXEIRA, D. O.; SILVA, H. V. R.; BRITO, B. F. et al. Sperm quality and morphometry characterization of cryopreserved canine sperm in acp-106c or tris. *Anim Reprod*, v. 19, n. 3, e20210069, 2022.

TESI, M.; SABATINI, C.; VANNOZZI, I. et al. Variables affecting semen quality and their relationship to fertility in dogs: a retrospective study. *Theriogenology*, v.118, p.34-39, 2018.

TSUTSUI, T. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *J Reprod Fertil Suppl*, v. 39, p. 269-275, 1989.

TSUTSUI, T.; HASE, M.; TANAKA, A. et al. Intrauterine and intravaginal insemination with frozen canine semen using an extender consisting of orvus ES paste-supplemented egg yolk tris-fructose citrate. *The Journal of Veterinary Medical Science*, v. 62, p. 603-606, 2000.

VIEIRA, N. M. G. Estresse oxidativo seminal em cães: estudo da susceptibilidade dos espermatozoides e possíveis terapias durante a criopreservação. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal, Universidade de São Paulo, 2018.

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.

WEINBERG, J. B.; DOTY, E.; BONAVENTURA, J. et al. Nitric oxide inhibition of human sperm motility. *Fertil Steril*, v. 64, n. 2, p. 408-413, 1995.

WITTAYARAT, M.; KIMURA, T.; KODAMA, R. et al. Long-term preservation of chilled canine semen using vitamin C in combination with green tea polyphenol. *Cryo-Lett*, v. 33, p. 318-326, 2012.

YAN, H. M.; HU, H.; AHMED, A. et al. Carnitineacylcarnitine translocase deficiency with c.199-10 T.G and novel c.1A.G mutation: two case reports and brief literature review. *Medicine (Baltimore)*, v. 96, e8549, 2017.

YANAGIMACHI, R. Fertilization of Mammals. In: KNOBIL, E., NEILL, J.D. (Eds.), *The physiology of reproduction*. Second edition. New York: Raven Press Ltd., p. 189-317, 1994.

CAPÍTULO 2

O diluidor de congelamento TRIS com 2% de gema de ovo protege de forma similar o espermatozoide congelado canino com a adição de baixas concentrações de l-carnitina

Isabela Carla Ferreira¹, Natalia de Castro Alves, Marina Morra de Freitas, Vinícius Alves Bastos, Cesar Lopes Horta, Rafael Romero Nicolino, Monique de Albuquerque Lagares

Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, São Luiz, CEP: 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil

¹ Autor para correspondência: Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos 6627, São Luiz, CEP: 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brasil, e-mail: isabelacsferreira@gmail.com

ABSTRACT

The request for artificial insemination with canine cryopreserved semen has increased. However, sperm quality and fertility are still lower than the cooled semen. During the freezing process, high proportion of seminal plasma is discarded to avoid *in vitro* sperm capacitation. Nonetheless, it increases sperm vulnerability to oxidative stress. Therefore, the addition of antioxidant substances to the canine sperm during semen freezing is of great interest to protect sperm against oxidative stress and increase their metabolism. This study aimed to enhance frozen canine semen quality with the addition of 5-, 7.5- and 10-mM L-carnitine (LC) to the TRIS frozen semen extender modified with 2% egg yolk. The frozen-thawed semen parameters were *in vitro* evaluated to sperm motility and kinematics, plasma membrane (PM) functionality and integrity, spontaneous acrosome reaction, lipid peroxidation, sperm morphology,

hydrogenperoxide, nitrite and malonaldehyde semen concentration. The average and standard error were calculated and analyzed with analysis of variance and compared with Duncan test. The probability of $P < 0,05$ was considered significant. There was no influence of the addition of 5- and 7.5-mM LC on sperm total motility (TM: 55.8 ± 6.7 and $46.1 \pm 6.6\%$) compared to the control ($51.3 \pm 4.1\%$, $P > 0.05$). However, 10 mM LC decreased TM ($24.6 \pm 4.0\%$) compared to other treatments ($P < 0.05$). The ALH was reduced with 10 mM LC compared to that in the control ($3.1 \pm 0.2 \times 3,6 \pm 0,1 \mu\text{m}$, $P < 0.05$), eventhough both did not differ from 5- and 7.5-mM LC (3.4 ± 0.1 e $3.3 \pm 0.1 \mu\text{m}$, $P > 0,05$). The rate of sperm PM integrity did not differ with LC addition in comparison to the control (39.2 ± 4.5 vs. $42.2 \pm 2.2 \%$, $P > 0.05$). However, 10 mM LC increased the percentage PM integrity compared to that in 7.5 mM LC (47.9 ± 3.8 x $34.4 \pm 6.0\%$, $P < 0.05$). The other variables did not differ among the treatments ($P > 0,05$). In conclusion, the modified TRIS semen frozen extender with 2% egg yolk preserved the characteristics of the frozen sperm as well as with low LC concentrations. On the other hand, LC in high concentration was harmful to sperm motility.

1 INTRODUÇÃO

A demanda por inseminação artificial com sêmen canino criopreservado tem aumentado. No entanto, a qualidade do esperma e a fertilidade ainda são inferiores ao sêmen resfriado (Peña et al., 2006a). Durante o processo de congelamento, uma alta proporção de plasma seminal é descartada para evitar a capacitação espermática *in vitro* (Bunyaga e Kashoma, 2018). No entanto, isso aumenta a vulnerabilidade do esperma ao estresse oxidativo.

A presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) está relacionada a condições fisiológicas que ocorrem nos processos de capacitação espermática, hiperativação, reação acrossômica e outros ainda não elucidados. Os espermatozoides possuem sistemas sensivelmente regulados para manter as EROs em concentrações basais, nas quais a produção e eliminação são precisamente balanceadas (Lushchak, 2014).

O espermatozoide canino executa diferentes estratégias metabólicas, como alta capacidade de metabolizar glicose (Fernández-Novell et al., 2004), plasticidade

metabólica (Bucci et al., 2010; Rigau et al., 2001, 2002), ativar vias anabólicas de síntese de glicogênio (Ballester et al., 2000) e usar glicogênio para funções de alta demanda energética (Albarracín et al., 2004a). A exceção do espermatozoide de outras espécies de mamíferos, o espermatozoide canino tem uma via de gliconeogênese, a qual usa o lactato extracelular para formação de estoques de glicogênio intracelular para a capacitação *in vitro* (Albarracín et al., 2004a). A energia necessária para o estoque interno do espermatozoide canino é obtida pela degradação dos depósitos de glicogênio em glicose, que é utilizada para a glicólise e, eventualmente, na fosforilação oxidativa mitocondrial (Rodríguez-Gil e Bonet, 2016). Portanto, a adição de substâncias antioxidantes ao esperma canino durante o congelamento do sêmen é de grande interesse para proteger os espermatozoides contra o estresse oxidativo e aumentar o seu metabolismo (Peña et al., 2003).

A LC é um antioxidante natural barato e livre de efeitos colaterais, demonstrado em ensaios com humanos a partir da administração oral (DiNicolantonio et al., 2019). Ela é capaz de aumentar o nível e a atividade de enzimas antioxidantes como a glutathione peroxidase e a superóxido dismutase (Neuman et al., 2002). O papel principal da LC é facilitar o transporte de acil-CoA graxo exógeno através da matriz mitocondrial (Brooks, 1979). Também possui atividades anti-apoptóticas e antioxidantes, pode inibir a peroxidação lipídica e proteger a membrana espermática de mamíferos (Gülçin, 2006; Yan et al., 2017), atuando na proteção da estrutura do DNA contra as espécies reativas ao oxigênio (EROS, Qi et al., 2006).

Nos espermatozoides caninos a LC se encontra em altas concentrações no plasma seminal (Farstad, 2009). O epidídimo é a principal fonte de carnitina no fluido seminal canino (Olson et al. 1987) que desempenha um papel importante na estabilização da membrana mitocondrial, no aumento do suprimento de energia das organelas e na proteção às células da morte celular apoptótica (Pillich et al. 2005).

Os diluidores de sêmen também têm função de proteger e manter a viabilidade e longevidade espermática (Peña et al., 2006b). Um dos diluidores mais usados na preservação do sêmen canino é o Tris base (Gil et al., 1970: Tris-hydroxymetano-aminometano 30,28g, frutose 12,5g, ácido cítrico monoidratado 17,8g, água bidestilada ad 1L, estreptomicina 100mg e penicilina 100.000 UI). Na composição do

diluidor TRIS para congelamento de sêmen, além do glicerol, se usa rotineiramente a concentração de 20% de gema de ovo (Silva et al., 2002). A gema do ovo possui proteínas de alto valor biológico, ácidos graxos essenciais, fosfolipídios e glicerol de grande aplicação industrial e biomédica (Oliveira et al., 2021). No entanto, a gema de ovo traz dificuldades de padronização pela variação em sua composição, além do risco de transmissão de doenças e de crescimento bacteriano nos diluidores de sêmen (Amirat-Briand et al., 2010; Anzar et al., 2019).

Até o presente momento não foram publicados estudos sobre a influência da adição de L- carnitina (LC) ao diluidor de congelamento de sêmen canino TRIS modificado com 2 % de gema de ovo sobre os parâmetros de avaliação da qualidade espermática e concentração de oxidantes produzida pelo espermatozoide canino congelado.

O presente estudo teve como objetivo aumentar a qualidade espermática do sêmen congelado canino com adição de L-carnitina (LC) ao diluidor TRIS de congelamento de sêmen modificado com 2 % de gema de ovo. A qualidade do sêmen foi avaliada *in vitro* quanto a motilidade e cinética espermática, funcionalidade e integridade de membrana plasmática, reação acrossômica espontânea, peroxidação lipídica, mensuração da concentração de H_2O_2 , NO_2^- e malonaldeído, morfologia espermática pós- congelamento- descongelamento.

2 MATERIAL E METÓDOS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob o protocolo 9/2022 (anexo 01).

2.1 Coleta de sêmen

Foi coletado um ejaculado de sete cães (n=7) clinicamente normais e com idade entre 2 e 7 anos. As raças avaliadas foram Bulldog Francês (n= 4), Pastor Alemão (n= 2) e Pastor Belga Malinois (n= 1). A seleção dos animais se deu pelo exame andrológico: histórico reprodutivo, exame clínico e espermograma. O sêmen foi coletado com a

técnica de de manipulação digital e um funil acoplado a um tubo Falcon de 14 mL. Com o intuito de coletar apenas a segunda fração do ejaculado, foi feita a coleta fracionada do sêmen.

2.2 Avaliação do sêmen fresco

Imediatamente após a coleta, o sêmen foi avaliado quanto a motilidade espermática progressiva, total, e vigor com o auxílio de um microscópio de campo claro (100x). Somente ejaculados com motilidade progressiva igual ou superior a 70% e vigor igual ou superior a 3 foram utilizados no experimento. A concentração espermática foi calculada com um hemocítômetro.

2.3 Congelamento do sêmen

O sêmen foi diluído na proporção de 1:1 com diluidor de Tris base (Gil et al., 1970: Tris-hydroxymetano-aminometano 30,28g, frutose 12,5g, ácido cítrico monoidratado 17,8g, água bidestilada ad 1L, estreptomicina 100mg e penicilina 100.000 UI), e centrifugado (600 x g, 10 min). O sobrenadante foi descartado de forma a deixar 10% do volume total do tubo. Foi realizada a homogeneização e calculada a concentração espermática do sedimento com um hemocítômetro. O sêmen foi ressuspendido para 100×10^6 esp./ml com diluidor de congelamento de sêmen TRIS com 6% de glicerol e modificado com 2 % de gema de ovo. A gema foi centrifugada (2.000 x g, 10 min) e o sobrenadante aspirado e adicionado ao meio de congelamento na concentração descrita. A concentração de 20% de gema de ovo no diluidor de TRIS de congelamento foi modificada para 2 % baseada na concentração usada nos diluidores de congelamento de sêmen equino (Pillet et al. 2008) e nos resultados de um pré-experimento. A motilidade espermática pós-descongelamento foi avaliada com as concentrações de gema de ovo 20% e 2%, sendo observado percentual de motilidade espermática semelhante a concentração de 2 % comparada a 20 % (dados não publicados). Os outros três tratamentos receberam suplementação de 0,161 g, 0,242 g e 0,322g de LC, respectivamente para cada 100 mL de diluidor Tris de congelamento

perfazendo 5-, 7,5- e 10- mM LC e totalizando quatro tratamentos: 1) Controle: Tris + 2% gema de ovo + 6% de glicerol, 2) 5mM, 3) 7,5mM e 4) 10mM LC.

As amostras foram envasadas em palhetas de 0,5ml, seladas e imediatamente resfriadas em uma curva de 0,27°C/min até a temperatura de 4°C por 1,5 horas em um container de isopor e gelo reciclável (Amann e Pickett, 1987). Posteriormente, as palhetas foram dispostas a 2,5cm de distância da superfície do nitrogênio líquido e após 20 min foram imersas diretamente no nitrogênio líquido. Em seguida as palhetas foram raqueadas e armazenadas em botijão de nitrogênio a -196°C.

2.4 Avaliação espermática pós-descongelamento

Após o descongelamento, as amostras de sêmen foram analisadas quanto a motilidade, cinemática e morfologia, integridade e funcionalidade de membrana plasmática, taxa de reação acrossômica espontânea, peroxidação lipídica espermática, e mensuração da concentração de nitrito, peróxido de hidrogênio e malonaldeído.

2.4.1 Análise da motilidade espermática computadorizada (CASA)

Uma palheta de cada tratamento foi descongelada a 37°C por 30 segundos em banho-maria e uma alíquota de 5 µL foi avaliada pelo sistema de análise computadorizada espermática (CASA, Sperm Class Analyser, SCA® 2005 VS 4.0.0 Microptik S.L., Barcelona, Espanha) quanto a motilidade total e progressiva, velocidade curvilínea (VCL-µm/s), velocidade média da trajetória (VAP-µm/s), velocidade linear progressiva (VSL-µm/s), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH-µm), frequência de batimento cruzado (BCF-Hz), retilinearidade (STR-%), linearidade (LIN-%) e oscilação (WOB- %). Foram analisados 5 campos/amostra. A configuração usada do CASA foi captura: 25 imagens capturadas por 25s; escala: objetiva 10×; área da partícula: >4 e <75 µm²; Velocidade curvilínea (VCL): lenta < 10, média > 10 e < 45, rápida > 90 µm/s; e circular <50% de linearidade (LIN).

2.4.2 Avaliação da integridade de membrana plasmática e taxa de reação acrossômica espontânea

A avaliação da integridade da membrana plasmática, acrossômica e reação acrossômica espontânea espermática foi realizada com citometria de fluxo com os corantes fluorescentes Iodeto de Propídeo (IP, Sigma P4170, Sigma Chemical St. Louis, MO, USA) e Isoticianato de fluoresceína-Peanut agglutinin (FITC-PNA, Sigma L7381, Sigma Chemical St. Louis, MO, USA). As amostras de sêmen descongeladas foram diluídas 1:20 em PBS (250 µL de sêmen:5 mL de PBS). Uma alíquota de 200µL dessa suspensão foi corada com FITC – PNA (1,125µg/mL) e incubada por 10 min. em banho-maria a 37° C. Posteriormente as amostras foram diluídas acrescentando-se 1mL de PBS, coradas com IP (1,5 mM) e incubadas por 10 min. a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram submetidas à leitura no citômetro de fluxo (FACScan, BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Dez mil eventos, a uma taxa de 500 células/seg. foram analisados por amostra (García-Macías et al., 2007; Oliveira et al., 2010).

Os resultados foram expressos em percentual das categorias espermáticas: PI+/PNA+ (membrana plasmática e acrossômica não íntegras), PI+/PNA- (membrana plasmática não íntegra e acrossômica íntegra), PI-/PNA- (membrana plasmática e acrossômica íntegras) e PI-/PNA+ (membrana plasmática íntegra e acrossômica não íntegra). Foram considerados espermatozóides com reação acrossômica espontânea somente os com resultado PI-/PNA+ e como espermatozóides viáveis sem reação acrossômica espontânea os com PI-/PNA-.

2.4.3 Avaliação da funcionalidade espermática

A porcentagem de espermatozoides com membrana funcional foi avaliada com o teste hiposmótico com água destilada (Lomeo e Giambersio, 1991) modificado por Lagares et al. (2000) na diluição 1:2 (sêmen: água destilada). Uma alíquota de 100 µL de sêmen (37°C) foi adicionada a 200 µL de água destilada (37°C), seguido de incubação em banho-maria (37°C, 5 min). Após o período de incubação, foram analisadas 200 células por amostra em microscopia de contraste de fase (400x). Foram considerados com membrana plasmática funcional os espermatozoides que reagiram positivamente

ao teste apresentando cauda enrolada (HOST+). O percentual de espermatozoides que apresentou cauda enrolada antes do HOST foi subtraído do percentual de HOST+. O resultado de espermatozoides que reagiram positivamente ao teste com cauda enrolada foi apresentado em porcentagem.

2.4.4 Peroxidação lipídica

O percentual de espermatozoides com peroxidação lipídica pós-descongelamento foi avaliado citometria de fluxo e a sonda lipídica fluorescente C11-BODIPY581/591 (Life Technologies Ltd., Grand Island, NY, EUA) (Partyka et al., 2011). Para tal, 20µl de sêmen foi centrifugado (500 xg, 5min), ressuscendido com 160 µl de PBS, foi adicionado 20µl de C11 -BODIPY581/591 (5 µM) e incubado no escuro (37°C, 30 min). As amostras foram centrifugadas novamente (500 xg, 5 min) e o sedimento foi ressuscendido com 500 µL de PBS. A fluorescência verde das amostras peroxidadas foi lida com citometria de fluxo no filtro BL-1 (530nm).

2.4.5 Mensuração da concentração de nitrito (NO_2^-)

A mensuração da concentração de espécies reativas ao nitrogênio foi realizada através da mensuração dos níveis de nitrito (NO_2^-) em µM/µg de proteína. O nitrito é um dos dois produtos primários, estáveis e não voláteis da decomposição do NO, e sua medição usando espectrofotometria com reagente de Griess (Green et al., 1982) é uma maneira de investigar a formação de óxido nítrico. O Griess Reagent System baseia-se na reação de diazotização química que utiliza 2% (p/v) de sulfanilamida e 0.2% (p/v) de dicloridrato de N-1-nafiletiletilenodiamina (NEED) sob condições ácidas (5% (v / v) de ácido fosfórico). O limite de detecção de nitrito é de 2,5 µM (125 pmol) (em água destilada ultrapura e deionizada). A absorbância das amostras foi determinada a 560 nm. Para tal, preparou-se o reagente de Griess no momento da análise e este foi mantido ao abrigo de luz durante todo o experimento. Em uma microplaca de 96 poços foi adicionado 50µL da amostra de sêmen descongelada (37°C, 30seg) de cada tratamento e 50µL do reagente de Griess e para o tratamento

branco foi adicionado 50µL de água destilada e 50µL de reagente de Griess em triplicata. Foi realizada a leitura da microplaca em espectrofotômetro a 560nm.

2.4.6 Mensuração da concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

A mensuração da concentração de espécies reativas ao hidrogênio (H₂O₂) foi realizada através da mensuração dos níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em µM/µg de proteína utilizando a espectrofotometria. A concentração de H₂O₂ foi medida pelo método modificado pela FOX-2 (Nourooz - Zadeh et al., 1994). Essa técnica é possível pela oxidação de íons ferrosos (Fe²⁺) a íons férricos (Fe³⁺) em condições ácidas, por hidroperóxidos lipídicos. O indicador utilizado é o xilenol Orange, que reage com os íons Fe³⁺ produzindo um cromóforo azul-arroxeadado com coeficiente de extinção $4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, detectado no espectrofotômetro de leitura a 560 nm. A concentração de H₂O₂ foi determinada nas amostras conforme o coeficiente de extinção molar de H₂O₂. Logo: $A_\lambda = \epsilon_\lambda \cdot C$, onde A_λ = absorvância a 560nm, ϵ_λ = coeficiente de extinção molar do cromóforo e C = concentração de hidroperóxidos (mol/mL).

2.4.7 Mensuração da concentração de malonaldeído

Para determinar a taxa de peroxidação lipídica estimada dos espermatozoides foi utilizada a medida do nível de malonaldeído (MDA), utilizando o ácido tiobarbitúrico (TBA), com base no método descrito por Buege e Aust (1978). Os níveis de malonaldeído foram mensurados após adição a 250 µL de sêmen em 500 µL do reagente TBA (15% de ácido tricloroacético, 0,25N de ácido clorídrico e 0,375% de ácido tiobarbitúrico) e 1% (v/v) de BHT 50mM, e toda essa solução foi fervida (100°C) por 15 min. Em seguida, as amostras foram resfriadas em gelo em raspas e centrifugadas (1.200 x g, 15 min.). O sobrenadante foi removido e mensurado no espectrofotômetro com a absorvância de 532 nm. A concentração de MDA se deu pela curva de calibração feita com MDA como padrão nas concentrações de 1 a 20mM. O MDA produzido foi expresso em µmol de TBARS/ml de diluidor.

2.4.8 Morfologia espermática

A percentagem de espermatozoides com morfologia normal e com defeitos foi avaliada com técnica de preparação úmida (Mies Filho, 1975). As amostras de sêmen foram preservadas em solução de formol salina tamponada e 100 espermatozoides foram avaliados com microscopia de contraste de fase (1000x).

2.5 Análise estatística

O delineamento experimental utilizou blocos ao acaso, sendo o cão considerado como bloco. A análise de variância, as médias e erro padrão foram calculados. Os valores médios da motilidade e cinemática espermática, concentração de peróxido de hidrogênio, nitrito, malonaldeído e percentual de espermatozoides que sofreram peroxidação lipídica, com membrana plasmática funcional e íntegra, e com reação acrossômica espontânea apresentou distribuição normal, os parâmetros GCP, defeito de cauda e rápidos não apresentaram. As médias foram analisadas com a análise de variância e comparadas com o Teste de Duncan. A probabilidade de $P < 0,05$ foi considerada significativa.

3 RESULTADOS

Sete cães sexualmente maduros (2 a 7 anos de idade) apresentaram ejaculados com motilidade total $\geq 50\%$ e vigor ≥ 3 (0-5).

Duas coletas de sêmen de cada cão foram realizadas com intervalo de uma semana e foi calculada a média das características avaliadas do sêmen fresco dos sete animais (Tabela 1). Os ejaculados apresentaram motilidade total (MT) variando de 80 a 90%, motilidade progressiva (MP) entre 70 e 90% e vigor espermático entre 3,5 e 5. Todas as características estavam dentro do desejável para criopreservação do sêmen de acordo com o Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). A concentração espermática variou de 180×10^6 a 330×10^6 esp./ml e o número total de espermatozoides no ejaculado de 270×10^6 a 845×10^6 (Tab.1).

Tabela 1: Características espermáticas do sêmen fresco (n=7).

Cão	MT (%)	MP (%)	Vigor (0-5)	Volume (ml)	Nº total esp. x 10 ⁶	Conc./ml x 10 ⁶
1	80	80	5	1,5	480,0	320
2	90	80	4	3,3	617,5	190
3	90	90	5	1,5	435,0	290
4	90	80	4	2	460,0	230
5	90	90	5	1,5	270,0	180
6	90	90	5	1,5	495,0	330
7	80	70	3,5	3,3	845,0	260
Média	87	83	4,5	2,1	514,6	258

MT= % motilidade total, MP= %motilidade progressiva, N° total esp.= número total de espermatozoides no ejaculado, Conc./ml= concentração espermática/ml

Não houve influência da adição de 5 e 7,5 mM de LC sobre o percentual de espermatozoides com MT comparada ao controle (Tab. 2, P<0,05). No entanto, a concentração de 10 mM de LC reduziu a MT comparada aos outros tratamentos (P<0,05). O ALH também sofreu redução com 10 mM LC comparado ao controle (P<0,05), embora estes dois tratamentos não tenham diferido de 5 e 7,5 mM (P>0,05).

As outras variáveis do CASA não diferiram entre os tratamentos (Tab. 2, P>0,05).

Tabela 2: Parâmetros espermáticos avaliados pelo CASA pós-descongelamento (média ± erro padrão)

Trat	MT %	MP %	Rápidos %	VAP µm/s	VSL µm/s	VCL µm/s	BCF Hz	STR %	LIN %	WOB %	ALH µm
0	51,3±4,1 ^a	14,8±6,1	6,1±3,4	29,5±4,4	22,8±3,9	47,8±5,3	10,7±0,3	75,9±2,0	46,0±3,0	60,3±2,5	3,6±0,1 ^a
5	55,8±6,7 ^a	12,8±4,2	5,3±2,3	28,0±4,1	21,7±4,1	44,3±5,0	10,8±0,8	74,8±4,3	47,1±4,9	62,0±3,2	3,4±0,1 ^{ab}
7,5	46,1±6,6 ^a	11,1±4,1	3,9±2,1	27,5±4,7	21,6±4,6	43,3±5,7	11,9±0,6	76,1±2,8	47,4±3,4	62,0±2,0	3,3±0,1 ^{ab}
10	24,6±4,0 ^b	4,0±2,0	1,6±1,2	22,5±3,6	17,1±3,8	35,9±3,8	10,9±0,7	72,8±3,7	45,1±4,3	61,3±2,7	3,1±0,2 ^b

^{ab} Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente (P < 0,05). 0= Controle, 5= 5mM LC, 7,5= 7,5mM LC, 10= 10mM LC MT= motilidade total, MP= motilidade progressiva, VAP= velocidade média da trajetória, VSL= velocidade linear progressiva, VCL= velocidade curvilínea; BCF= frequência de batimento cruzado, STR= retilinearidade, LIN= linearidade, WOB= índice de oscilação, ALH= deslocamento lateral de cabeça, Trat=tratamentos.

O percentual de espermatozoides com membrana funcional, com R.A. e com peroxidação lipídica (BODIPY) não diferiu entre os tratamentos (Tab.3, P>0,05). A

taxa de espermatozoides com membrana íntegra não diferiu com adição de LC comparada ao controle. No entanto, a concentração de 7,5 mM de LC teve menor percentual de MP íntegra em relação a 10 mM (Tab.3, $P < 0,05$).

Tabela 3: Percentual de espermatozoides com membrana plasmática funcional e íntegras, e com reação acrossômica pós-descongelamento (média $\pm$ erro padrão)

Trat.	MP funcional (%)	M. íntegra (%)	R.A. espontânea (%)	Peroxidação lipídica (%)
0	51,0 $\pm$ 8,7	42,2 $\pm$ 2,2 ^{ab}	0,70 $\pm$ 0,21	7,96 $\pm$ 2,91
5	58,6 $\pm$ 4,3	35,2 $\pm$ 3,6 ^{ab}	0,68 $\pm$ 0,20	5,80 $\pm$ 1,0
7,5	57,4 $\pm$ 8,2	34,4 $\pm$ 6,0 ^a	0,90 $\pm$ 0,36	4,20 $\pm$ 0,44
10	43,1 $\pm$ 9,9	47,9 $\pm$ 3,8 ^b	0,90 $\pm$ 0,23	4,75 $\pm$ 0,90

^{ab} Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($P < 0,05$). 0= Controle, 5= 5mM de LC, 7,5= 7,5mM de LC, 10= 10mM de LC, MP= Membrana plasmática, M= membranas espermáticas, R.A.= Reação acrossômica, Trat=tratamentos

A adição de LC ou não ao diluidor de congelamento não influenciou a concentração de NO_2^- , H_2O_2 e de malonaldeído produzida pelo espermatozoide no sêmen pós-descongelamento entre os tratamentos (Tab. 4, $P > 0,05$).

Tabela 4: Concentrações de nitrito (NO_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de malonaldeído no sêmen pós-descongelamento (média $\pm$ erro padrão).

Tratamentos	NO_2^- $\mu\text{M}/\mu\text{g}$ de proteína	H_2O_2	Malonaldeído μmol de TBARS/ml
0	3,2 $\pm$ 0,4	7,5 $\pm$ 0,8	0,053 $\pm$ 0,0
5	2,9 $\pm$ 0,5	7,4 $\pm$ 1,0	0,056 $\pm$ 0,002
7,5	2,9 $\pm$ 0,3	6,9 $\pm$ 0,5	0,046 $\pm$ 0,008
10	3,7 $\pm$ 0,5	8,5 $\pm$ 1,1	0,057 $\pm$ 0,003

Não houve diferença estatística das variáveis entre os tratamentos ($P > 0,05$), 0= Controle, 5= 5mM de LC, 7,5= 7,5mM de LC, 10= 10mM de LC.

Não houve diferença estatística quanto ao percentual de espermatozoides morfolologicamente normais e com defeitos entre os tratamentos (Tab. 5, $P > 0,05$).

Tabela 5: Percentual de espermatozoides morfolologicamente normais e com defeitos pós-descongelamento. (média $\pm$ erro padrão).

T	Normais %	Cauda %	GCP %	GCD %	Cabeça %	PI %
0	78,4 $\pm$ 4,3	18,1 $\pm$ 4,5	0,0 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,2	3,1 $\pm$ 1,0	0,1 $\pm$ 0,1
5	73,0 $\pm$ 5,7	22,9 $\pm$ 5,6	0,0 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 0,3	3,4 $\pm$ 1,2	0,1 $\pm$ 0,1
7,5	76,9 $\pm$ 6,0	19,9 $\pm$ 5,8	0,1 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,3	2,3 $\pm$ 0,5	0,3 $\pm$ 0,2
10	69,4 $\pm$ 6,3	26,4 $\pm$ 6,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,7 $\pm$ 0,4	3,3 $\pm$ 1,1	0,4 $\pm$ 0,2

Não houve diferença estatística das variáveis entre os tratamentos ($P > 0,05$), 0= Controle, 5= 5mM de LC, 7,5= 7,5mM de LC, 10= 10mM de LC, T= Tratamentos, GCP e GCD= Gota Citoplasmática Proximal e Distal

4 DISCUSSÃO

No presente estudo, embora nenhuma concentração de LC testada tenha aumentado a motilidade e a cinética espermática, a concentração de 10 mM LC reduziu a MT e o ALH comparado ao grupo controle.

O acréscimo de LC aos meios de congelamento de sêmen de diversas espécies tem apresentado efeitos benéficos sobre a qualidade do sêmen. Em humanos, o sêmen congelado acrescido de 0,5 mg/ml de LC apresentou melhora da motilidade e vigor espermáticos (Banihani et al., 2013). A adição de 5 mM de LC ao diluidor de sêmen congelado caprino aumentou o percentual de espermatozoides com MT e MP, funcionalidade de membrana e reduziu a reação acrossômica comparada ao controle (Heidari et. al., 2022). Quando o sêmen de coelho foi resfriado com o meio Tris com 0,5, 1 e 2 mM de LC foi observado aumento da motilidade e da integridade de membrana espermática (Sariözkan et. al, 2014). No mesmo estudo, a concentração de 2 mM de LC ainda reduziu a taxa de reação acrossômica *in vitro* dos espermatozoides comparadas ao controle. A adição de 1mM de LC ao espermatozoide equino pós-descongelamento aumentou a cinemática (STR), a concentração de Ca^{++} espermático e a fertilidade *in vivo*, além de reduzir a concentração de nitrito (Lagares et al., 2021). Os autores concluíram que a LC tem ação antioxidante e estimuladora do metabolismo do espermatozoide criopreservado equino.

É possível que a diferença entre os resultados positivos, em relação a motilidade e cinemática espermática relatados com outras espécies, possa ter relação com o metabolismo espermático de cada uma. A via metabólica utilizada pelo espermatozoide é definida pelas demandas e condições do meio e do trato genital feminino (Storey, 2008). Diferente de outras espécies mamíferas, o gerenciamento de energia do espermatozoide canino, além da obtenção de energia de fontes externas, se baseia na produção de energia para estoques intracelulares (Rodríguez-Gil e Bonet, 2016). O espermatozoide canino possui grande capacidade para aumentar seu metabolismo oxidativo quando adequadamente tratado, e no caso de haver uma interrupção do metabolismo oxidativo, ele pode se suprir pela via gliconeogênica (Foutouhi e Meyers, 2022).

Alterações do equilíbrio de LC e Acetil carnitina no sêmen via acetil transferase também podem modificar a motilidade espermática (Hinton et al., 1981). O tratamento do sêmen com alta concentração de LC pode alterar esse equilíbrio, levando ao aumento da concentração de acetil carnitina e o consequente aumento de resíduos de acil. Nos espermatozoides, a relação entre acetil-CoA e CoA livre é fundamental para a produção de ATP e manutenção da motilidade (Calvin e Tubbs, 1976). Como os resíduos de acil estão disponíveis de forma limitada para a transferência de CoA, o metabolismo do espermatozoide é inibido (Hinton et al., 1981). Uma alta proporção de acetil-CoA para CoA livre inibe a piruvato desidrogenase, impedindo a produção adicional de ATP por meio do ciclo do ácido cítrico (Jeulin e Lewin, 1996). Isso pode ser observado no espermatozoide congelado equino imediatamente após a adição de 0,5, 1 e 2 mM LC ao sêmen pós- descongelamento acarretando redução da MT (Lagares et al., 2021). Em alta concentração a LC suprimiu a absorção de oxigênio, do espermatozoide bovino (20 mM, Deana et al., 1989), ao contrário do espermatozoide humano (Bohmer e Johansen, 1978), onde a demanda energética se dá principalmente pela via glicolítica.

Portanto, no presente experimento, é possível que a redução da MT com a adição de 10 mM de LC ao sêmen canino possa ter levado a uma mudança da taxa metabólica do espermatozoide induzindo a modificação da localização do suprimento dos substratos energéticos (Chadt e Al-Hasani, 2020). A LC em alta concentração pode ter suprimido a absorção de oxigênio (Deana et al., 1989), e ao invés de usar a via da

β oxidação dos ácidos, o espermatozoide canino pode ter convertido o piruvato a lactato. Este possivelmente foi usado na via de gliconeogênese para a formação do estoque intracelular de glicogênio. Consequentemente, ao invés de aumentar a MT como esperado, foi observada a redução da mesma.

Outra possível alternativa para a redução da motilidade espermática com alta concentração de LC no presente estudo, pode estar relacionada a alta relação de acetil-CoA intracelular: CoA livre, não permitindo o restabelecimento do equilíbrio inicial (Golan et al., 1984).

No presente estudo, a redução do ALH não foi acompanhada de redução do VCL e aumento da LIN, portanto, provavelmente não ocorreu hiperativação espermática.

Um aumento significativo do VCL e ALH e uma diminuição na linearidade são considerados indicativos de hiperativação espermática (Verstegen et al., 2002; Schäfer-Somi e Aurich, 2007).

O espermatozoide canino pode usar diferentes vias metabólicas, nas quais as hexoses podem ser desviadas (Albarracín et al., 2004a) para as vias catabólicas da glicólise e do ciclo de Krebs, e síntese de glicogênio e o ciclo das pentoses fosfato (Rigau et al., 2002; Ballester et al., 2000).

Portanto, no estudo atual, a redução do ALH com 10 mM LC pode estar relacionado também a alterações das vias metabólicas espermática. Essas vias metabólicas são capazes de alterar a localização de proteínas transportadoras de substrato energético (Bucci et al., 2010), reduzindo a motilidade espermática. Outra possível causa para redução da ALH é que tenha ocorrido o desequilíbrio da proporção de Acetil-CoA: CoA livre inibindo a piruvato desidrogenase e impedindo a produção de ATP via ciclo do ácido cítrico (Jeulin e Lewin, 1996).

No presente experimento, as concentrações de LC testadas não influenciaram a taxa de espermatozoides com membrana íntegra, com reação acrossômica, peroxidação lipídica e nem a produção de oxidantes em comparação ao controle. No entanto, 10

mM de LC protegeu mais a integridade de membrana que a concentração de 7,5mM de LC.

As espécies reativas ao oxigênio (ROS) são continuamente produzidas durante eventos fisiológicos normais e podem facilmente iniciar a peroxidação dos lipídios da membrana, levando ao acúmulo de peróxidos lipídicos (Gülçin, 2006). Portanto, mecanismos de redução da disponibilidade de lipídios para peroxidação, como o da LC podem apresentar ação antioxidante beneficiando a viabilidade celular (Zhang et al., 2016). A função protetora da LC ao espermatozoide também foi comprovada através da interação com os fosfolipídios da membrana e modulação da fluidez da membrana plasmática do espermatozoide de galo (Fattah et al., 2017). Outro mecanismo antioxidante da LC é exercido através do transporte de grupos acetil do piruvato para a matriz mitocondrial e o tamponamento da CoA livre (Gülçin, 2006).

Uma vez que o espermatozoide canino pode usar a via de gliconeogênese, é possível que no experimento atual, excesso de piruvato e lactato produzidos como produtos da glicólise e fosforilação oxidativa tenham sido encaminhados para esta via. Consequentemente, a LC não teve ação antioxidante aditiva aos espermatozoides comparada com meio diluidor utilizado no controle.

No presente experimento, optou-se pelo uso de 2% de gema de ovo no diluidor base TRIS devido ao resultado semelhante da MT em um ensaio prévio comparando a 20% de gema (dados não publicados).

Na composição do diluidor TRIS de sêmen canino tem sido preconizada a concentração de 20% de gema de ovo (Silva et al., 2002). No entanto, testes laboratoriais evidenciaram que alta concentração de gema pode interferir bioquímica e metabolicamente nas células espermáticas (Wall e Foot, 1999). Assim, concentrações mais baixas de gema de ovo têm sido adicionadas a diluidores de sêmen de espécies como a equina (2%, Pillet et al., 2008) e caprina (1,5%, Ritar e Salamon, 1982).

No presente estudo, parece que o diluidor TRIS com 2% de gema de ovo preservou as características espermáticas avaliadas tão bem quanto quando foi adicionada a LC

em baixas concentrações. No entanto, nas concentrações testadas a LC não levou a um efeito benéfico aditivo ao diluidor modificado.

De acordo com o presente estudo foi possível inferir que o diluidor TRIS com a concentração de 2% de gema de ovo sem e com adição de LC em baixas concentrações protegeu de forma eficiente todos os parâmetros espermáticos avaliados do sêmen congelado caninos, sem aumento da produção de oxidantes em todos os tratamentos.

5 CONCLUSÃO

O diluidor de sêmen TRIS com 2% de gema de ovo protegeu de forma eficiente todos os parâmetros espermáticos avaliados do sêmen canino congelado. No entanto, em baixas concentrações a LC não apresentou efeito aditivo benéfico, e em alta concentração a LC foi prejudicial a motilidade espermática.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBARRACÍN, J. L.; FERNANDEZ-NOVELL, J. M.; BALLESTER, J. et al. Gluconeogenesis-linked glycogen metabolism is important in the achievement of in vitro capacitation of dog spermatozoa in a medium without glucose. *Biology of Reproduction*, v. 71, p. 1437-1445, 2004a.
- ALBARRACÍN, J. L.; MOGAS, T.; PALOMO, M. J. et al. In vitro capacitation and acrosome reaction of dog spermatozoa can be feasibly attained in a defined medium without glucose. *Reprod Domest Anim*, v. 39, p. 129-135, 2004b.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Vet. Prac.*, v. 7, n. 3, p. 145-173, 1987.
- AMIRAT-BRIAND, L.; BENCHARIF, D.; VERA-MUNOZ, O. et al. In vivo fertility of bull semen following cryopreservation with an LDL (low-density lipoprotein) extender: Preliminary results of artificial inseminations. *Animal Reproduction Science*, v. 122, n. 3-4, p. 282-287, 2010.
- ANZAR, M.; RAJAPAKSHA, K.; BOSWALL, L. Egg yolk-free cryopreservation of bull semen. *PLoS One*, v. 14, n. 10, p. e0223977, 2019.
- BALLESTER, J.; FERNANDEZ-NOVELL, J. M.; RUTTLANT, J. et al. Evidence for a functional glycogen metabolism in mature mammalian spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, v. 56, p. 207-219, 2000.
- BANIHANI, S.; AGARWAL, A.; SHARMA, R. et al. Cryoprotective effect of L-carnitine on motility, vitality and DNA oxidation of human spermatozoa. *Andrologia*, v. 46, p. 637-641, 2014.
- BOHMER, T.; HOEL, P.; PURVIS, K. et al. Carnitine levels in human accessory sex organs. *Archives of Andrology*, v. 1, n. 1, p. 53-59, 1978.
- BUCCI, D.; ISANI, G.; SPINACI, M. et al. Comparative Immunolocalization of GLUTs 1, 2, 3 and 5 in boar, stallion and dog Spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.*, v. 45, p. 315-322, 2010.
- BUCCI, D.; RODRIGUEZ-GIL, J. E.; VALLORANI, C. et al. GLUTs and Sperm Metabolism in Mammals. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 32, p. 348-355, 2011.
- BUCCI, D.; SPINACI, M.; BUSTAMANTE-FILHO, I. C. et al. Sperm mitochondria: clues and challenges. *Anime Playback*, v. 19, n. 4, e20220131, 2022.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, v. 52, p. 302-310, 1978.

- BUNYAGA, A. S.; KASHOMA, I. P. et al. Cryopreservation of dog semen as an alternative method to improved fertility in bitches: A review article. *Manakin*, p. 216-227, 2018.
- CALVIN, J.; TUBBS, P. K. A carnitine : acetyl- $\rightarrow$ carnitine exchange system in spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, v. 48, p. 417-420, 1976.
- CARRELL, D.T.; KUNECK, P.H.; PETERSON, C.M. et al. A randomized, prospective analysis of five sperm preparation techniques before intrauterine insemination of husband sperm. *Fertil. Steril.*, v.69, p.122-126, 1998.
- CHADT, A.; AL-HASANI, H. Glucose transporters in adipose tissue, liver, and skeletal muscle in metabolic health and disease. *Pflugers Arch.*, v. 472, p. 1273-1298, 2020.
- CHLOPIK, A.; WYSOKINSKA, A. Canine spermatozoa—What do we know about their morphology and physiology? An overview. *Reprod. Domest. Anim.*, v. 55, p. 113-126, 2020.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (CBRA). Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. CBRA, 2013.
- CONCANNON, P. W.; BATTISTA, M. Canine semen freezing and artificial insemination. In: KIRK, R. W. (Ed), *Current Veterinary Therapy, Small Animal Practice*, X. W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 1247-1259, 1989.
- DEANA, R.; RIGONI, F.; FRANCESCONI, M. et al. Effect of L-carnitine and L-aminocarnitine on calcium transport, motility, and enzyme release from ejaculated bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction*, v. 41, p. 949–955, 1989.
- DOAK, R. L.; HALL, A.; DALE, H. E. Longevity of spermatozoa in the reproductive tract of the bitch. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 13, p. 51-58, 1967.
- ENGLAND, G. C. W., PLUMMER, J. M. Hypo-osmotic swelling of dog spermatozoa. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, v. 47, p. 261-270, 1993.
- FATTAH, A.; SHARAFI, M.; MASOUDI, R. et al. L-Carnitine in rooster semen cryopreservation: Flow cytometric, biochemical and motion findings for frozen-thawed sperm. *Cryobiology*, v. 74, p. 148-153, 2017.
- FERNÁNDEZ-NOVELL, J. M.; BALLESTER, J.; MEDRANO, A. et al. The presence of a high-Km hexokinase activity in dog, but not in boar, sperm. *FEBS Letters*. V. 570, p. 211-216, 2004.
- FOUTOUHI, A.; MEYERS, S. Comparative oxidative metabolism in mammalian sperm. *Anim Reprod Sci*, v. 247, p. 107095, 2022.
- GARCÍA-MACÍAS, V., DE PAZ, P., MARTINEZ-PASTOR, F. et al. DNA fragmentation assessment by flow cytometry and Sperm-Bos-Halomax (bright-field

microscopy and fluorescence microscopy) in bull sperm. *Int. J. Androl.* V. 30, p. 88–98, 2007.

GAWLIK, V.; SCHMIDT, S.; SCHEEPERS, A. et al. Targeted disruption of Slc2a8 (GLUT8) reduces motility and mitochondrial potential of spermatozoa. *Mol. Membr. Biol.*, v. 25, p. 224-235, 2008.

GIBB, Z.; AITKEN, R. J. The Impact of Sperm Metabolism during In Vitro Storage: The Stallion as a Model. *Biomed Res Int.*, e9380609, 2016.

GILL, H. P.; KAUFMAN, C. F., FOOTE, R. H. et al. Artificial insemination of beagle bitches with freshly collected, liquid-stored, and frozen-stored semen. *Am J Vet Res*, v. 31, p. 1807-1813, 1970.

GOLAN, R.; WEISSENBERG, R.; LEWIN, L. Carnitine and acetylcarnitine in motile and immotile spermatozoa. *International Journal of Andrology*, v. 7, p. 484-494, 1984.

GREEN, R. E.; AHUJA, L. R.; CHONG, S. K. et al. Water conduction in Hawaii oxic soils. *Tech. Rept.* n. 143, Water Resour. Res. Center, Univ. of Hawaii, Honolulu, 1982.

GÜLÇİN, I. Antioxidant and antiradical activities of L-Carnitine. *Life Sci*, v. 78, p. 803-811, 2006.

HEIDARI, M.; QASEMI-PANAHI, B.; MOGHADDAM, G. et al. L-carnitine improves quality parameters and epigenetic patterns of buck's frozen-thawed semen. *Animal Reproduction Science*, v. 247, p. 107092, 2022.

HINTON, B. T.; BROOKS, D. E.; DOTT, H. M. et al. Effects of carnitine and some related compounds on the motility of rat spermatozoa from the caput epididymidis. *J. Reprod. Fertil.*, v. 61, p. 59-64, 1981.

JEULIN, C.; LEWIN, L. M. Role of free L-carnitine and acetyl-L-carnitine in post-gonadal maturation of mammalian spermatozoa. *Hum Reprod Update*. v. 2, p. 87–102, 1996.

LAGARES, M.A.; MEIRELLES, L. S.; WALD, V. B. et al. Efeito de diferentes diluentes sobre a membrana plasmática do espermatozóide eqüino e fertilidade do sêmen resfriado. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v.7, n.3, p.153-156, 2000.

LAGARES, M. A.; SILVA, G. C.; CORTES, S. F. et al. L-carnitine added to post-thawed semen acts as an antioxidant and a stimulator of equine sperm metabolism. *First International Journal of Andrology Andrologia*, v. 54, e14338, 2021.

LECEWICZ, M.; STRZEZEK, R.; KORDAN, W. et al. Effect of extender supplementation with low molecular weight antioxidants on selected quality parameters of cryopreserved canine spermatozoa. *Journal of Veterinary Research*. v.62, n.2, p.221-227, 2018.

- LINDE-FORSBERG, C.; FORSBERG, M. Fertility in dogs in relation to semen quality and the time and site of insemination with fresh and frozen semen. *J. Reprod. Fertil. Suppl.*, v. 39, p. 299–310, 1989.
- LOMEO, A. M.; GIAMBERSIO, A. M. "Water test": a simple method to assess sperm membrane integrity. *Int J Androl.*, v. 14, p. 278–282, 1991.
- LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem. Biol. Interact.*, v. 224, p. 164–175, 2014.
- MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol.*, v. 53, p.109–119, 2002.
- MICHAEL, A.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E. et al. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology*, v. 68, p. 204–212, 2007.
- MIES FILHO, A. Tecnologia do sêmen I – Exame e classificação. In: *Reprodução dos animais e inseminação artificial*. Porto Alegre: Sulina, 3 ed., v.2, p.423-458, 1975.
- MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A. et al. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen–thawed bull semen. *Theriogenology*, v. 57, p. 1695–1706, 2002.
- NOUROOZ-ZADEH, J.; TAJADDINI-SARMADI, J.; WOLFF, S. P. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous-oxidation xylene orange (FOX) assay in conjunction with triphenylphosphine. *Anal. Biochem.*, v. 220, p. 403- 409, 1994.
- OLIVEIRA, C. H.; VASCONCELOS, A. B.; SOUZA, F. A. et al. Cholesterol addition protects membrane intactness during cryopreservation of stallion sperm. *Animal Reproduction Science*. v 118, p.194–200, 2010.
- OLIVEIRA, L. L. N.; AGUIAR, Q. H. S. L.; LIMA, F. S. et al. Refrigeração de sêmen canino com diluente a base de leite e gema de ovo 2%. *Medicina Veterinária (UFRPE)*, v. 15, n. 3, p. 270–275, 2021.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (2010). Manual de Laboratório da OMS para o Exame e processamento de sêmen humano (5ª ed.). Genebra, Suíça: WHO Press.
- PARTYKA, A.; LUKASZEWICZ, E.; NIZANSKI, W. et al., Detection of lipid peroxidation in frozen-thawed avian spermatozoa using C11-BODIPY581/591, *Theriogenology*, v. 75, n. 9, p. 1623–1629, 2011.
- PEÑA, F.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M. et al. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after

cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 78, p. 85-98, 2003.

PEÑA, F. J.; NÚÑEZ-MARTÍNEZ, I.; MORÁN, J. M. Semen technologies in dog breeding: an update. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 41, p.21–29, 2006a.

PEÑA, A. I.; BARRIO, M.; BECERRA, J. J. et al. Influence of the extender and the centrifugation on the quality of the canine spermatozoa stored at 4 °C. *Animal Reproduction Science*, v. 92, p. 337-345, 2006b.

PILLET, E.; BATELLIER, F.; DUCHAMP, G. et al. Freezing stallion semen in INRA96-based extender improves fertility rates in comparison with INRA82. *Dairy Sci Technol.*, v.88, n. 2, p. 257-265, 2008.

RIGAU, T.; FARRÉ, M.; BALLESTER, J. et al. Effects of glucose and fructose on mobility patterns of dog spermatozoa from fresh ejaculates. *Theriogenology*, v. 56, p. 801-815, 2001.

RIGAU, T.; RIVERA, M.; PALOMO, M. J. et al. Differential effects of glucose and fructose on hexose metabolism in dog spermatozoa. *Reproduction*, v. 123, n. 4, p. 579-591, 2002.

RITAR, A. J.; SALAMON, S. Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. *Aust. J. Biol. Sci.*, v. 35, p. 305–312, 1982.

RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; BONET, S. Current knowledge on boar sperm metabolism: comparison with other mammalian species. *Theriogenology*, v. 85, p. 4–11, 2016.

SARIOZKAN, S.; OZDAMAR, S.; TURK, G. et al. In vitro effects of l-carnitine and glutamine on motility, acrosomal abnormality, and plasma membrane integrity of rabbit sperm during liquid-storage. *Cryobiology*, v. 68, p. 349–353, 2014.

SCHÄFER-SOMI, S.; AURICH, C. Use of a new computer-assisted sperm analyzer for the assessment of motility and viability of dog spermatozoa and evaluation of four different semen extenders for predilution. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 102, p. 1-13, 2007.

SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S.; UCHOA, D. C et al. Effect of Tris-Buffer, Egg Yolk and Glycerol on Canine Semen Freezing. *The Veterinary Journal*, v. 164, p. 244-246, 2002.

SILVA, L. D. M.; VERSTEGEN, J. P. Comparisons between three different extenders for canine intrauterine insemination with frozen-thawed spermatozoa. *Theriogenology*, v. 44, p. 571-579, 1995.

SRTZEZEK, R.; KOZIOROWSKA-GILUN, M.; KOWALÓWKA, J. et al. Characteristics of antioxidant system in dog semen. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, v. 12, n. 1, p. 55–60, 2009.

STOREY, B.T. Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe. *The International Journal of Developmental Biology*, v. 52, p. 427-437, 2008.

TSUTSUI, T. Gamete physiology and timing of ovulation and fertilization in dogs. *J Reprod Fertil Suppl*, v. 39, p. 269-275, 1989.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer-assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v. 57, p. 149-179, 2002.

VIEIRA, N. M. G. Estresse oxidativo seminal em cães: estudo da susceptibilidade dos espermatozoides e possíveis terapias durante a criopreservação. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal, Universidade de São Paulo, 2018.

WALL, R. J.; FOOT, R. H. Fertility of bull sperm frozen and stored in clarified egg yolk-tris-glycerol extender. *J Dairy Sci*, v. 84, p.817-821, 1999.

ZHANG, G.; WANG, Z.; LING, X. et al. Mitochondrial biomarkers reflect semen quality: results from the MARCHS study in Chongqing, China. *PLoS ONE*, v. 11, e0168823, 2016.

1. ANEXO I – PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

 UFMG	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
Prezado(a):	
Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.	
Protocolo CEUA: 9/2022 Título do projeto: Adição de diferentes concentrações de L-carnitina ao sêmen canino pré-congelamento Finalidade: Pesquisa Pesquisador responsável: Monique de Albuquerque Lagares Unidade: Escola de Veterinária Departamento: Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária	
Situação atual: Decisão Final - Aprovado	
Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 28/03/2022. Validade: 28/03/2022 à 27/03/2027.	
Belo Horizonte, 28/03/2022.	
Atenciosamente,	
Sistema Solicite CEUA UFMG https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/	
Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3409-4516 www.ufmg.br/bioetica/ceua - ceua@prpq.ufmg.br	