

MAÍRA MORALES BRITO

**Efeito da senescência reprodutiva sobre aspectos morfológicos,
funcionais e de estresse oxidativo do sêmen fresco e criopreservado de cães**

São Paulo

2017

MAÍRA MORALES BRITO

**Efeito da senescência reprodutiva sobre aspectos morfológicos,
funcionais e de estresse oxidativo do sêmen fresco e criopreservado de cães**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientadora:

Profa. Dra. Camila Infantsi Vannucchi

SÃO PAULO

2017

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3452
FMVZ

Brito, Maíra Morales

Efeito da senescência reprodutiva sobre aspectos morfológicos, funcionais e de estresse oxidativo do sêmen fresco e criopreservado de cães. / Maíra Morales Brito. -- 2017.

111 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Profa. Dra. Profa. Dra. Camila Infantsi Vannucchi.

1. Espermatozoides caninos 2. Senescência reprodutiva. 3. Estresse oxidativo. 4. Criopreservação. I. Título.



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Senescência reprodutiva em cães: efeito espermático no sêmen fresco e criopreservado", protocolado sob o CEUA nº 7045270115, sob a responsabilidade de **Gamila Infantosi Vannuochi e equipe; Maira Morales Brito** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMZV) em reunião de 29/04/2015.

We certify that the proposal "Reproductive senescence in dogs: spermatic effect on fresh and cryopreserved semen", utilizing 12 Dogs (12 males), protocol number CEUA 7045270115, under the responsibility of **Gamila Infantosi Vannuochi and team; Maira Morales Brito** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - It's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was approved by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of São Paulo University (CEUA/FMZV) in the meeting of 04/29/2015.

Vigência da Proposta: de 03/2015 a 12/2016

Área: Departamento De Reprodução Animal

Procedência: **Canis particulares**

Especie: **Cão**

Gênero: **Machos**

Idade: **a partir de 1 ano**

N: **12**

Linhagem: **várias**

Peso: **10 a 20 kg**

São Paulo, 19 de novembro de 2015

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo



Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Camila Infantes Vannucchi

Área: Reprodução Animal

Camila Infantes Vannucchi (orientador)

Título da proposta: "Senescência reprodutiva em cães: efeito espermático no sêmen fresco e criopreservado".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 08/março/2015) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Após exame de qualificação houve ajuste do delineamento experimental para que o experimento se adeque mais a responder a questão proposta. O n experimental passará a ser de 18 cães machos."

Comentário da CEUA: "O aumento do número de animais foi devidamente justificado no projeto. "

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BRITO, Maíra Morales

Título: Efeito da senescência reprodutiva sobre aspectos morfológicos, funcionais e de estresse oxidativo do sêmen fresco e criopreservado de cães

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do Título de Mestre em Ciências

DATA ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*À minha mãe, sempre guerreira,
À minha tia Eliana, minha prima Biba e meu tio Chris, meus companheiros à
distância,
Aos meus amigos e amigas, a família que escolhi,
Ao meu amor e confidente,
E aos meus mestres que me ajudaram nesta jornada.*

“O meu mundo não é como o dos outros, quero demais, exijo demais; há em mim uma sede de infinito, uma angústia constante que eu nem mesma compreendo, pois estou longe de ser uma pessimista; sou antes uma exaltada, com uma alma intensa, violenta, atormentada, uma alma que não se sente bem onde está, que tem saudade... sei lá de quê!”

(Florabela Espanca)

AGRADECIMENTOS

Os finais sempre nos remetem ao começo. E os começos sempre vêm cheios de novidades. Entrar na pós-graduação foi um novo mundo, cheio de esperança, renovação, força de vontade e de... medos e incertezas. Cada um sabe o que passa para trilhar seu próprio caminho, cada um sabe as passagens que seguiu e as consequências das escolhas feitas. Mas chegar aqui traz como resultado um saldo infinito de novos conhecimentos, novos contatos, novas amizades, novas experiências e, acima de tudo, uma nova Maíra. Se hoje alcancei mais esta conquista, certamente não foi sozinha e aqui me reservo o direito de agradecer a todos que deram suas contribuições ao longo dessa jornada.

Em primeiro lugar, agradeço à minha mãe, quem me acompanhou lado a lado nesses 25 anos de turbulência de voo. Independente dos momentos de dificuldade e incerteza ela esteve aqui, bem perto de mim, me dando todo amor e conforto que eu poderia receber. Mãe, se tem alguém em quem eu me espelho como exemplo de coragem, de caráter e de amor e amizade incondicionais, essa pessoa é você. Pode ter certeza que farei de tudo para que as coisas continuem caminhando e que sempre estarei aqui para você, assim como você sempre esteve aqui para mim. Continuemos sendo fortes como sempre fomos, coisas cada vez melhores estão a caminho e isso é só o começo, temos muito o que aproveitar e ser felizes.

Família a gente não escolhe, mas não sei se por sorte ou por escolha de espíritos, tive o imensurável contentamento e alegria em partilhar do mesmo sangue que duas mulheres de peito. Minha tia Eliana e minha prima Gabriela, companheiras de uma vida inteira. Já disse e repito novamente: dizem que antes de nascermos nós escolhemos a qual família queremos pertencer nesta vida, eu diria que não poderia ter feito escolha melhor. Muito obrigada por fazerem tanto e tudo por mim. Hoje eu sou quem eu sou porque sempre tive o apoio e amparo de uma segunda mãe e uma irmã. Isso não começou nesta vida e nem termina por aqui, nossa ligação é muito mais forte do que os sentimentos mundanos. Mais feliz ainda sou eu, que pude ter a oportunidade de ter um tio inglês com tamanho zelo, dedicação, educação e empatia. Transmito aqui meus agradecimentos ao meu tio Chris. Uncle Chris, even from a distance, I know I can count on you, in all those years I could not have anyone better as an uncle, thank you for everything and wait for me for a tour in England. Obrigada por tudo, eu amo vocês incondicionalmente.

Os anos que se passaram foram em diversas ocasiões bastante turbulentos, mas me trouxeram alguém muito especial. Dentre as idas e vindas dessa maré de lua cheia, recebi um presente iluminado. Alguém que me traz força, que faz de mim uma pessoa melhor e que está sempre ao meu lado, me ajudando e contribuindo para dias mais leves e alegres. Lucas, amorzinho, pius ou pitotinho, você chegou num momento em que eu estava no meio de um labirinto e foi você quem me trouxe a luz e permaneceu comigo buscando o caminho. Tenho certeza de que muito chão ainda está por vir e, ainda bem, este é só o começo. Eu te amo infinitamente e só tenho a agradecer por ter você junto de mim. Você faz meus dias melhores e eu já não me vejo mais sem você.

Ainda sobre a família, há aqueles em que não dividimos sangue, mas dividimos alma. Estas são minhas mais do que amigas. Débora, Sofia, Jéssica, landara, Catarina, Ieda, Natália, Mariana, Thábata, Karina e Camila. Apesar da distância e dos trajetos diferentes, nossa união não tem mais fim. Agradeço cada momento e cada risada compartilhada com vocês.

Não poderia deixar de fora meu querido LIAPP. Este lugar foi onde aprendi grande parte de tudo que sei e é a este grupo a quem devo todos os resultados aqui contidos. Muito obrigada ao Dani, Rê (♀), Rê (♂), Lê, Thay, Clau, à antiga geração Cris, Li, Fê e Gi, às ICs Ana Bia, Biazinha, Bia, Isa, Gi e Carol, ao Daneba (que é quase LIAPPano) e aos nossos estagiários, em especial a Ana. Aproveito o momento para agradecer aos demais pós graduandos do VRA, mas em especial aos do LA e do GEMA: Brunão, Giulia, Diego, Nívea e Andressa.

Agradeço aos institutos e laboratórios que possibilitaram a realização do meu trabalho: Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia, em especial para a Nicolle e Professora Cristina Massoco; IPEN – mais especificamente ao laboratório da Professora Maria Helena Bellini, a Flavia e a Cinthia; Laboratório de Biologia do Espermatozoide; Laboratório de Dosagens Hormonais; Grupo de Estudo para Multiplicação de Aves e ao Laboratório de Andrologia. Sem a ajuda de vocês eu estaria perdida!

Finalmente, agradeço à pessoa que topou viver essa loucura junto comigo. Professora Camila, ou simplesmente Pro, muito obrigada por todos os ensinamentos, todas as lições, todas as conversas no banco de vaquinha, todas as oportunidades e todas as conquistas compartilhadas. Sem dúvida alguma foi uma experiência muito profunda partilhar com você uma trajetória de ensinamentos e

pesquisas. Muito obrigada por todo acolhimento, toda paciência, todo carinho e por todo tempo dedicado a mim, mesmo quando os assuntos não diziam respeito à pós graduação e projetos.

Agradeço imensamente a segunda casa que tive nesses anos todos. A FMVZ certamente me trouxe muita coisa e não poderia ficar de fora. Em especial, gostaria de agradecer alguns professores que, mais do que ministrar conteúdos obrigatórios, transbordam a arte e a paixão por ensinar, representados aqui pela Professora Claudia, Professora Mayra e Professor Marcilio.

Mais especificamente ainda, agradeço ao VRA pela oportunidade deste mestrado, um departamento sem dúvidas muito caloroso. Agradeço a todos os professores e funcionários, mas em especial, agradeço à Roberta, Loide, Harumi, Professor Ricardo, Ira, Camilla e Priscilla. Por fim, agradeço à USP, aos funcionários da pós graduação e a CAPES e a FAPESP pelo auxílio financeiro.

“O agradecimento é a memória do coração” – Lao Tse

*Birds flying high you know how I feel
Sun in the sky you know how I feel
Reeds drifting on by you know how I feel
It's a new dawn it's a new day it's a new life for me
And I'm feeling good*

*Fish in the sea you know how I feel
River running free you know how I feel
Blossom in the trees you know how I feel
It's a new dawn it's a new day it's a new life for me
And I'm feeling good*

*Dragonflies all out in the sun
You know what I mean, don't you know
Butterflies are all having fun
You know what I mean
Sleep in peace
When the day is done
And this old world is a new world and a bold world for me*

*Stars when you shine you know how I feel
Scent of the pine you know how I feel
Yeah freedom is mine
And you know how I feel
It's a new dawn it's a new day it's a new life for me*

*Butterflies, ooh
Oh, ooh...
Ooooh...
Freer than you...
Ooooh
Feeling good*

Resumo

Brito, M. M. **Efeito da senescência reprodutiva sobre aspectos morfológicos, funcionais e de estresse oxidativo do sêmen fresco e criopreservado de cães.** [Effect of reproductive senescence on morphological, functional and oxidative stress features of fresh and cryopreserved sperm in dogs]. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O presente estudo teve como objetivos comparar o sêmen de cães jovens e senis, por avaliação morfo-funcional, estresse oxidativo e quantificação de produtos avançados de glicação (AGEs); comparar a congelabilidade seminal de cães jovens e senis e verificar a ação dos produtos avançados de glicação, oxidação proteica e estresse oxidativo na criopreservação seminal de cães senis. Foram selecionados 22 cães, alocados em dois grupos experimentais de acordo com a idade: Grupo Jovem (n=11) e Grupo Senil (n=11). Os grupos foram adicionalmente subdivididos em Grupo Sêmen Fresco e Grupo Sêmen Criopreservado. A divisão etária foi realizada de acordo com o porte dos animais, sendo porte pequeno considerado senil a partir de 8 anos de idade, porte médio a partir de 7 anos de idade e porte grande acima de 6 anos de idade. Independentemente do porte, os cães jovens em idade reprodutiva foram considerados entre 1 e 5 anos de idade. O Grupo Fresco foi submetido a avaliações seminais imediatas, incluindo volume, cor, aspecto do ejaculado, concentração espermática e análise computadorizada da motilidade (CASA). Logo após, foram realizadas avaliações morfo-funcionais, incluindo atividade mitocondrial dos espermatozoides, estresse oxidativo lipídico, estresse oxidativo proteico, dosagem de produtos avançados de glicação e dosagem de concentração proteica, citometria de fluxo utilizando as sondas fluorescentes para a avaliação espermática da integridade de membrana plasmática e acrossomal e de potencial de membrana mitocondrial e análise de fragmentação de DNA. O Grupo Congelado foi submetido ao protocolo de congelamento em uma etapa e após, no mínimo uma semana, as amostras foram descongeladas a 37°C por 30 segundos e, então, avaliadas quanto à concentração espermática, análise computadorizada da motilidade (CASA) e as mesmas avaliações morfo-funcionais realizadas para o Grupo Jovem. Como resultados, os machos do Grupo Jovem apresentaram maior escore de libido, parâmetros da motilidade espermática, alta atividade mitocondrial dos espermatozoides e menores valores de atividade mitocondrial média, defeitos

espermáticos totais, defeitos espermáticos maiores e gota citoplasmática proximal. No sêmen fresco, o Grupo Jovem obteve maiores valores de integridade da membrana acrossomal dos espermatozoides e baixo potencial de membrana mitocondrial, assim como menores valores de integridade da membrana plasmática e acrossomal e alto potencial de membrana mitocondrial. No sêmen descongelado, o Grupo Jovem apresentou maiores valores de integridade de membrana acrossomal dos espermatozoides. No sêmen de cães jovens, o Sub-grupo Fresco obteve maiores valores de integridade de membrana acrossomal e integridade de membrana acrossomal com lesão de membrana plasmática. No sêmen de cães senis, o Sub-grupo Fresco apresentou maiores valores de integridade de membrana acrossomal, integridade de membrana plasmática e acrossomal e alto potencial de membrana mitocondrial, assim como menor porcentagem de espermatozoides com baixo potencial de membrana mitocondrial. Na comparação entre os sub-grupos, houve maiores valores para parâmetros da motilidade espermática, integridade de membrana plasmática com lesão de acrossomo, médio potencial de membrana mitocondrial, integridade de membrana plasmática, alta atividade mitocondrial e estresse oxidativo no Sub-grupo Descongelado, além de maiores valores de amplitude de deslocamento lateral da cabeça, espermatozoides estáticos, lesão de membrana acrossomal e plasmática, média atividade mitocondrial e concentração de proteínas no *pellet* de espermatozoides. A partir de tais resultados, é possível concluir que o sêmen de cães senis apresenta qualidade inferior ao de cães jovens, bem como reduzida congelabilidade. Nos cães senis, possivelmente, a falha na eliminação da gota citoplasmática dos espermatozoides promova disfunções mitocondriais, culminando na alteração da motilidade espermática. Por fim, as avaliações de parâmetros oxidativos não se mostram acuradas para a avaliação do impacto da senescência reprodutiva.

Palavras-chave: Espermatozoides caninos, Senescência reprodutiva, Estresse oxidativo, Criopreservação

Abstract

Brito, M. M. **Efeitos da senescência reprodutiva sobre parâmetros do sêmen fresco e criopreservado de cães.** [Reproductive senescence effects on fresh and cryopreserved dog's semen parameters]. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

This study aimed to compare the semen of young and senile dogs, through the evaluation of morphological and functional attributes, oxidative stress and quantification of advanced glycation ending products (AGEs); compare the seminal freezability of young and senile dogs and evaluate the effects of advanced glycation ending products, oxidation protein and oxidative stress on seminal cryopreservation of senile dogs. Twenty two dogs were selected and allocated into two experimental groups according to their age: Young Group (n=11) and Senile Group (n=11). These groups were additionally divided into Fresh Semen Group and Frozen Semen Group. Age distribution was performed according to the size of the animals, being small animals considered senile from 8 years of age onwards, medium size from 7 years old and large size over 6 years old. Regardless of the body size, dogs were considered young if they were at reproductive maturity from 1 to 5 years old. The Fresh Group was subjected to immediate seminal assessments, including volume, color, aspect of the ejaculate, sperm concentration and computer analysis of sperm motility (CASA). Then morpho-functional assessments were carried out, including sperm mitochondrial activity, lipid oxidative stress, protein oxidative stress, dosage of advanced glycation ending products and of protein concentration, flow cytometry using fluorescent probes to evaluate plasmatic and acrosomal membrane integrity and mitochondrial membrane potential and DNA fragmentation analysis. The semen from the Frozen Group was submitted to one step freezing protocol and samples were thawed after not less than 1 week at 37°C for 30 seconds and evaluated for sperm concentration, motility computerized analysis (CASA) and same the morpho-functional analysis performed for the Young Group. Male dogs from the Young Group presented higher libido score, parameters of sperm motility, percentage of sperm with high mitochondrial activity and lower percentage of sperm of medium mitochondrial activity, total spermatic defects, major spermatic defects and proximal cytoplasmic droplet. For the fresh semen of the Young Group, higher values of acrosomal

membrane integrity and low mitochondrial membrane potential, as well as lower values of plasma and acrosomal membrane integrity and high mitochondrial membrane potential were noticed. In the post-thaw semen, the Young Group showed higher values of spermatic acrosomal membrane integrity. For the semen of young dogs, the Fresh Group had higher values of acrosomal membrane integrity and acrosomal membrane integrity with plasma membrane damage. In the semen of senile dogs, the Fresh Group presented higher values of acrosomal membrane integrity, plasma and acrosomal membrane integrity and high mitochondrial membrane potential, as well as lower percentage of sperm with low mitochondrial membrane potential. Comparing sub-groups, higher values for sperm motility parameters, plasma membrane integrity with acrosome injury, medium mitochondrial membrane potential, plasmatic membrane integrity, high mitochondrial activity and oxidative stress was noticed for the Thawed group, as well as greater values of lateral displacement amplitude of the sperm head, static spermatozoa, acrosomal and plasmatic membrane lesions, medium mitochondrial activity and protein concentration in the spermatozoa pellet. Based on the present results, it is possible to conclude that the semen of senile dogs presents inferior quality compared to young dogs, as well as less freezability. The possible failure to eliminate the sperm cytoplasmic droplet in senile dogs sperm promotes mitochondrial dysfunctions, culminating to alterations on sperm motility. Finally, the evaluation of oxidative parameters is not feasible for the impact evaluation of reproductive senescence.

Keywords: Dog sperm, Reproductive senescence, Oxidative stress, Cryopreservation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reação de Maillard (BEM e KUNDE, 2006).....	29
Figura 2 - Interações entre a glicação e estresse oxidativo na mitocôndria celular (Imagem própria, 2017)	31
Figura 3 - Modelo hipotético gráfico do presente experimento (Imagem própria, 2017).	37
Figura 4 - Setup do aparelho de análise automatizada da motilidade espermática para o sêmen da espécie canina (Imagem própria, 2017).	45
Figura 5 - Delineamento experimental (Imagem própria, 2017).	52
Figura 6 - Efeito de concentrações crescentes de BSA em peróxido de hidrogênio 1,14M para avaliação da técnica de oxidação de proteínas modificada...54	
Figura 7 – Escore de libido (1-3) nos Grupos Jovem e Senil. * Indica diferença estatística entre grupos para $p=0,0071$	56
Figura 8 – Porcentagem de espermatozoides com integridade de membrana acrossomal e lesão de membrana plasmática e integridade de membrana plasmática e acrossomal, avaliados por sondas fluorescentes na citometria de fluxo no sêmen fresco dos Grupos Jovem e Senil. * Indica diferença estatística entre grupos para $p<0,05$	59
Figura 9 – Porcentagem de espermatozoides com alto e baixo potencial de membrana mitocondrial avaliados por sondas fluorescentes em citometria de fluxo no sêmen fresco dos Grupos Jovem e Senil. * Indica diferença estatística entre grupos para $p<0,05$	59
Figura 10 – Porcentagem de espermatozoides com integridade de membrana acrossomal por esfregaço corado em Fast Green / Rosa Bengala, no sêmen descongelado para os grupos Jovem e Senil. * Indica diferença estatística entre grupos para $p=0,0014$	60
Figura 11 – Porcentagem de espermatozoides com integridade de membrana acrossomal por esfregaço corado em Fast Green / Rosa Bengala nos Grupos Fresco e Descongelado para cães jovens. * Indica diferença estatística entre grupos para $p=0,0007$	61
Figura 12 – Porcentagem de espermatozoides com integridade de membrana acrossomal e lesão de membrana plasmática nos grupos Fresco e	

Descongelado para cães jovens. * Indica diferença estatística entre grupos para $p=0,0036$	61
Figura 13 – Porcentagem de espermatozoides com integridade de membrana acrossomal por esfregaço corado em Fast Green / Rosa Bengala nos grupos Fresco e Descongelado para cães senis. * Indica diferença estatística entre grupos para $p<0,0001$	62
Figura 14 – Porcentagem de espermatozoides com integridade de membrana plasmática e acrossomal nos grupos Fresco e Descongelado para cães senis. * Indica diferença estatística entre grupos para $p=0,0316$	63
Figura 15 – Porcentagem de espermatozoides com alto e baixo potencial de membrana mitocondrial nos grupos Fresco e Descongelado para cães senis. * Indica diferença estatística entre grupos para $p<0,05$	63
Figura 16 - Velocidade média da trajetória (VAP) e linearidade da motilidade nos grupos Jovem e Senil. * Indica diferença estatística entre grupos para $p<0,05$	64
Figura 17 – Porcentagem de espermatozoides com alta e média atividade mitocondrial nos grupos Jovem e Senil. * Indica diferença estatística entre grupos para $p<0,05$	65
Figura 18 – Porcentagem de espermatozoides com defeitos espermáticos totais, defeitos espermáticos maiores e gota proximal nos grupos Jovem e Senil. * Indica diferença estatística entre grupos para $p<0,05$	66
Figura 19 - Análise de correlação da variável oxidação de proteínas no plasma seminal com as variáveis de lesão de membrana plasmática e acrossomal, amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) e linearidade de motilidade.....	69
Figura 20 - Análise de correlação do estrógeno sérico com as variáveis de oxidação de proteínas no pellet de espermatozoides e velocidade média da trajetória (VAP).....	69
Figura 21 - Análise de correlação da oxidação de proteínas no plasma seminal com os produtos avançados de glicação no plasma seminal e integridade de membrana plasmática e acrossomal.....	70
Figura 22 - Análise de correlação do estrógeno sérico com a atividade mitocondrial nula.....	70

Figura 23 - Análise de correlação da testosterona sérica com as variáveis de defeitos espermáticos menores e produtos avançados de glicação no plasma seminal.	70
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Animais alocados nos grupos experimentais e a respectiva raça, porte, peso e idade. São Paulo, 2017	41
Tabela 2 - Poder do Teste e respectivas unidades experimentais (n) nas comparações entre os grupos experimentais (Jovem e Senil) para as variáveis de defeitos espermáticos totais, porcentagem de gota proximal e linearidade dos espermatozoides. São Paulo, 2017.....	43
Tabela 3 - Coeficientes intra e inter ensaio para o hormônio estradiol. São Paulo, 2017	50
Tabela 4 - Coeficiente intra ensaio para o hormônio testosterona. São Paulo, 2017*	50
Tabela 5 – Concentração de testosterona e estrógeno séricos nos grupos Jovem e Senil. São Paulo, 2017	55
Tabela 6 - Variáveis seminais nos Grupos Jovem e Senil.	56
Tabela 7 - Valores de probabilidade (p) para os efeitos principais Idade (Jovem e Senil) e Processamento (Fresco e Descongelado) e sua interação (Idade X Processamento) para as distintas variáveis seminais. São Paulo, 2017	57
Tabela 8 - Variáveis de integridade de membrana acrossomal (esfregaço corado em DAB) e oxidação de proteína no pellet de espermatozoides para o sêmen fresco nos grupos Jovem e Senil. São Paulo, 2017	60
Tabela 9 - Variáveis seminais para o sêmen descongelado nos grupos Jovem e Senil. São Paulo, 2017	60
Tabela 10 - Variáveis seminais nos grupos Fresco e Descongelado para cães jovens. São Paulo, 2017.....	62
Tabela 11 - Variáveis seminais nos grupos Fresco e Descongelado de cães senis. São Paulo, 2017.....	63
Tabela 12 - Variáveis da análise computadorizada da motilidade (CASA) nos Grupos Jovem e Senil. São Paulo, 2017	64
Tabela 13 - Variáveis seminais nos Grupos Jovem e Senil. São Paulo, 2017	65
Tabela 14 - Variáveis seminais nos Grupos Jovem e Senil. São Paulo, 2017	66

Tabela 15 - Variáveis da análise computadorizada da motilidade (CASA) nos Grupos Fresco e Descongelado. São Paulo, 2017	67
Tabela 16 - Variáveis seminais nos Grupos Fresco e Descongelado. São Paulo, 2017	67
Tabela 17 - Variáveis seminais nos Grupos Fresco e Descongelado. São Paulo, 2017	68
Tabela 18 - – Composição do diluidor utilizado no processo de criopreservação de sêmen de cão. São Paulo, 2017	93
Tabela 19 - Análise de correlação entre as variáveis de avaliação morfofuncionais e oxidativas do sêmen e hormonais em cães jovens. São Paulo, 2017	94
Tabela 20 - Análise de correlação entre as variáveis de avaliação morfofuncionais e oxidativas do sêmen e hormonais em cães senis. São Paulo, 2017	103

LISTA DE ABREVIÇÕES

- AGEs – Produtos Avançados de Glicação
- ALH – Amplitude de Deslocamento Lateral da Cabeça (μm)
- BCF – Frequência de Batimento Flagelar Cruzado (Hz)
- CASA – Computer Assisted Sperm Analysis
- DAB – 3,3'-diaminobenzidina
- DAB I – Alta atividade mitocondrial
- DAB II – Média atividade mitocondrial
- DAB III – Baixa atividade mitocondrial
- DAB IV – Atividade mitocondrial nula
- EROs – Espécies Reativas de Oxigênio
- FITC-PSA – Sonda fluorescente aglutinina de *Psium sativum* conjugada com isotiocianato de fluoresceína
- HPB – Hiperplasia Prostática Benigna
- IMPs – Partículas Intramembranas
- JC-1 – Iodeto de 5,5',6,6' tetracloro 1,1,3,3' tetraetilbenzimidazolicarbocianina
- LIN – Linearidade (%)
- MDA – Malondialdeído
- PI – Iodeto de Propídeo
- STR – Retilinearidade (%)
- TBA – Ácido Tiobarbitúrico
- TBARS – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
- TCA – Ácido Tricloroacético
- UCPs – Proteínas Desacopladoras
- VAP – Velocidade Média da Trajetória ($\mu\text{m/s}$)
- VCL – Velocidade Curvilínea ($\mu\text{m/s}$)
- VSL – Velocidade Linear ($\mu\text{m/s}$)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
2. REVISÃO DE LITERATURA	28
2.1. As teorias do envelhecimento	28
2.1.1. A reação de Maillard	28
2.1.2. O estresse oxidativo tecidual	30
2.2. Função mitocondrial	32
2.3. Alterações reprodutivas no envelhecimento	33
2.4. Criopreservação seminal e os efeitos no espermatozoide	34
3. HIPÓTESE	37
4. OBJETIVOS	39
5. MATERIAL E MÉTODOS	41
5.1. Animais e grupos experimentais	41
5.2. Análise do poder de teste	43
5.3. Avaliação da libido	44
5.4. Avaliação seminal	44
5.4.1. <i>Exames imediatos (análise computadorizada da motilidade e concentração espermática)</i>	44
5.4.2. <i>Testes espermáticos funcionais e morfológicos (morfologia espermática, integridade de membrana plasmática e membrana acrossomal, atividade mitocondrial e fragmentação de DNA)</i>	46
5.4.3. <i>Análise por citometria de fluxo (integridade de membrana acrossomal e de membrana plasmática e potencial de membrana mitocondrial)</i>	47
5.4.4. <i>Análise da Peroxidação Lipídica (TBARS), Oxidação de Proteínas, Dosagem de Produtos Avançados de Glicação (AGEs) e Concentração de proteínas</i>	48
5.5. Perfil hormonal	50
5.6. Análise estatística	51
6. RESULTADOS	54
6.1. Padronização de técnicas	54
6.1.1. Padronização da avaliação de oxidação de proteínas	54
6.2. Avaliação da senescência reprodutiva nos parâmetros seminais de amostras frescas e criopreservadas	55
6.2.1. Análise das dosagens de testosterona e estrógeno	55
6.2.2. Análises seminais nos Grupos Jovem e Senil	55
6.2.3. Análise seminal de acordo com os grupos experimentais (Jovem X Senil) e processamento do sêmen (Fresco X Descongelado)	56
6.3. Análise de correlação	68

6.3.1. Grupo Jovem	68
6.3.2. Grupo Senil	69
7. DISCUSSÃO	72
8. CONCLUSÃO	79
9. REFERÊNCIAS	81
8. ANEXOS	93
8.1. Anexo 1 – Diluidor a base de Tris-Gema-Citrato (BRITO et al., 2017)	93
8.2. Anexo 2 – Análise de correlação para o grupo jovem	94
8.3. Anexo 3 – Análise de correlação para o grupo senil.....	103

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Diante do notório avanço da Medicina Veterinária, os animais têm se tornado mais longevos. Em associação a tal progresso, o mercado pet vem crescendo exponencialmente a cada ano, assim como o número de cães nos lares brasileiros. Como consequência, cada vez mais cães em idade avançada são utilizados como reprodutores, porém não há conhecimento das consequências do uso destes padreadores senis nos resultados de fertilidade. Desta maneira, na atualidade, os médicos veterinários deparam-se com uma área de atuação em geriatria animal, na qual diversas situações decorrentes da senilidade são verificadas (BELLOWS et al., 2015). Por outro lado, tais circunstâncias são relativamente desconhecidas e pouco estudadas, dificultando a abordagem médica ao paciente geriátrico (GUNES et al., 2016).

Os estudos sobre a senescência reprodutiva da espécie canina ganharam grande enfoque nas pesquisas, tanto para aplicação na espécie, como para modelo de estudos em humanos, pois o homem apresenta tendência à reprodução tardia. O modelo canino é de grande valia, pois os cães possuem acesso a opções de cuidados de saúde, por meio de diversas especialidades veterinárias, análogas à medicina humana (GILMORE e GREER, 2015). De acordo com os últimos autores, os cães dividem com o homem sua casa, e até os hábitos de exercícios, com enfermidades ocorrendo naturalmente à semelhança das condições humanas, posicionando tal espécie como um poderoso e excepcional modelo de envelhecimento.

Na reprodução animal, observa-se diminuição da capacidade reprodutiva conforme o envelhecimento e, especificamente nos machos, possível alteração na qualidade seminal. Portanto, a maior expectativa de vida da espécie canina ampliou a área de estudo em andrologia e biotecnologia da reprodução, denominada senescência reprodutiva. Mesmo com os avanços observados nas técnicas de reprodução assistida, pouco se conhece do envolvimento dos fatores desencadeadores do envelhecimento no *status* reprodutivo animal. Neste contexto, torna-se desafiador decifrar a fisiologia reprodutiva de animais senis, caracterizando alterações funcionais da célula espermática.

O envelhecimento possui efeito aparente na função testicular em humanos e, para a espécie canina, há indícios de que a espermatogênese pode ser incompleta nos indivíduos senis (PETERS et al., 2001). Em humanos, também foi verificado redução da qualidade espermática por causas patológicas ou naturais do envelhecimento, configurando uma importante causa de infertilidade masculina (LIU et al., 2015). Já nos cães senis, sabe-se que tendem a apresentar menor porcentagem de espermatozoides normais no ejaculado (RIJSSELAERE et al., 2007).

Diferentes teorias acerca do envelhecimento biológico foram desenvolvidas e o centro em comum é a descrição da perda da funcionalidade progressiva com a idade, com consequente aumento da susceptibilidade e incidência de doenças (MOTA et al., 2004). Independente da influência genética, os fatores estocásticos (aleatórios) também podem ser determinantes para a longevidade, sugerindo que a perda funcional no envelhecimento decorre do acúmulo aleatório de lesões, associadas à ação ambiental, provocando o declínio fisiológico progressivo (MOTA et al., 2004). Dentre os fatores estocásticos encontram-se diferentes teorias bioquímicas à influência temporal, incluindo o surgimento do processo de glicação e o estresse oxidativo nos tecidos orgânicos, fazendo-se necessários experimentos com o objetivo de esclarecer a influência de tais processos no envelhecimento reprodutivo na espécie canina. Como a reação de Maillard, também conhecida como processo de glicação, promove transformações diretamente relacionadas ao envelhecimento (DYER et al., 1991), a avaliação dos níveis de seus produtos (produtos avançados de glicação – AGEs) no sêmen torna-se fonte de informação interessante a respeito do efeito da senescência reprodutiva. Tais conhecimentos poderão dar subsídios à instituição de terapias anti-envelhecimento a partir da suplementação animal, visando ao melhor desempenho reprodutivo após a senescência.

Diante do exposto, maiores entendimentos a respeito dos parâmetros seminais de cães senis poderão contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos na fisiologia e patogenia da senescência reprodutiva em cães. Neste particular sentido, a avaliação de atributos morfo-funcionais do sêmen, estresse oxidativo, oxidação de proteínas e avaliação dos níveis de AGEs no sêmen foram selecionados no presente estudo para elucidar os referidos processos de envelhecimento. Ainda, a busca por maiores esclarecimentos sobre o emprego da

criopreservação seminal em cães idosos pode contribuir para criar alternativas para manutenção do potencial reprodutivo durante a senescência.

Revisão de Literatura

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. As teorias do envelhecimento

2.1.1. A reação de Maillard

Durante o envelhecimento dos tecidos, ocorre diminuição da atividade biossintética e aumento da atividade proteolítica, causando a perda tecidual (LABAT-ROBERT e ROBERT, 2014). Dentre os desencadeadores do envelhecimento, destaca-se a possibilidade de ocorrência da chamada *reação de Maillard* nos tecidos orgânicos, conceitualmente uma reação espontânea (não catalisada) de redução de açúcares e derivados com grupos amina-livre em qualquer proteína ou nucleotídeos base (DYER et al, 1991). Tal reação culmina com a formação de glicosilamina, a qual sofre transformações químicas, originando produtos avançados de glicação (AGEs) (HELLWIG e HENLE, 2014).

A reação de Maillard inicia-se com a condensação do grupo carbolixa de um açúcar (p.e., a glicose) com um grupo amina proveniente de uma proteína, lipídeo ou ácido nucléico, formando a base de Schiff. Os açúcares redutores reagem de forma reversível com a amina para formar a base de Schiff (a qual pode originar um anel para formar a glicosilamina) e, por ser muito instável, sofre uma reação chamada rearranjo de Amadori, originando um composto de Amadori, o qual, após diversas reações, formam os AGEs (FENNEMA et al., 2008; MONNIER, 2003; SINGH et al., 2001) (Figura 1).

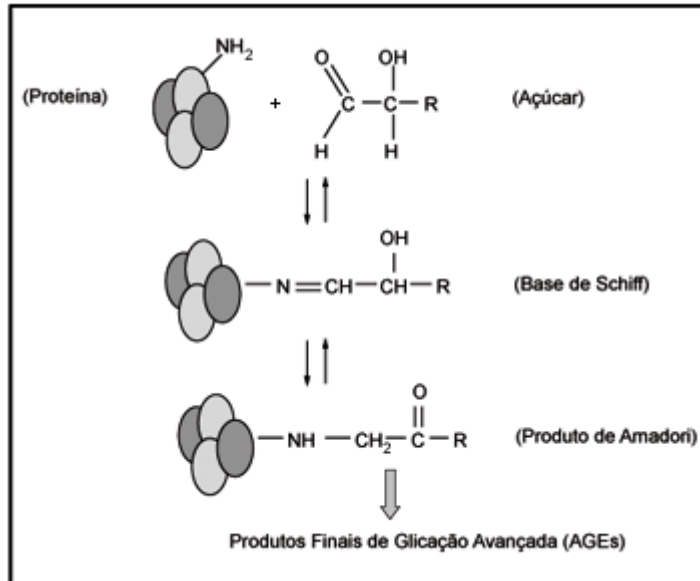


Figura 1 - Reação de Maillard (BEM e KUNDE, 2006).

A formação dos AGEs é, em sua maioria, endógena, porém também pode ocorrer introdução destas moléculas de maneira exógena, através de alimentação e tabagismo. Alimentos ricos em lipídeos e carboidratos e métodos de preparo utilizando altas temperaturas e baixa umidade são a principal fonte exógena de AGEs (GOLDBERG et al., 2004). Em condições fisiológicas, os AGEs são formados em um processo lento e gradual que afeta, geralmente, moléculas de meia vida longa, como componentes da membrana basal e componentes estruturais da matriz celular (SINGH et al., 2001). Porém, em condições hiperglicemiantes a formação de AGEs aumenta significativamente (BROWNLEE, 2005).

Os produtos AGEs podem interferir com as funções fisiológicas normais por diversos mecanismos, tais como a ligação cruzada com proteínas, produção de radicais livres, modificações pós-traducionais de proteínas, inativação de enzimas, citotoxicidade, diminuição da capacidade antioxidante e mutagênese (HELLWIG e HENLE, 2014; LABAT-ROBERT e ROBERT, 2014). Conforme Mota et al. (2004), as modificações de proteínas pela glicose, ocasionadas pela reação de Maillard, levam à formação de ligações cruzadas graduais no colágeno, característica dos indivíduos idosos. Tal processo provoca a deterioração estrutural e funcional dos tecidos. Macromoléculas modificadas por AGEs apresentam alteração estrutural importante e irreversível, comprometendo sua função biológica (DYER et al., 1991; ARSOV et al., 2014). Tais moléculas apresentam características fluorescentes por alterações moleculares causadas pelos rearranjos (SATTARAHMADY et al., 2007) e quanto

maior a intensidade de modificação da molécula, mais fluorescência será emitida (SCHMITT et al, 2005).

Embora seja prevalente em situações de hiperglicemia, a formação de AGEs também ocorre na doença renal crônica e em estados inflamatórios crônicos, como artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal, Alzheimer e aterosclerose (ARSOV et al., 2014; TAM et al., 2013; KATO et al., 2008). Até o momento, não foram encontrados estudos comparativos entre a produção de AGEs decorrentes da reação de Maillard e o *status* reprodutivo em qualquer espécie animal.

Além do processo de glicação, a senescência desencadeia o estresse oxidativo tecidual, resultando em acúmulo de espécies reativas de oxigênio e diminuição da defesa antioxidante local (PACE et al., 2010). Os processos de senescência celular podem ser exacerbados quando, simultaneamente, há formação de AGEs e o estresse oxidativo, ou seja, a glicação de macromoléculas invariavelmente associa-se à modificação das mesmas por processos oxidativos, exacerbando o estresse oxidativo, criando um ciclo no qual o estresse oxidativo favorece a glicação e vice-versa (KOYAMA e NISHIZAWA, 2010).

2.1.2. O estresse oxidativo tecidual

Segundo Mota et al. (2004), o envelhecimento é agravado pelo acúmulo de lesões moleculares provocadas pelos radicais livres nos componentes celulares, principalmente provenientes de espécies reativas de oxigênio (EROs), levando à perda funcional e à doença, conforme o estágio de vida. A oxidação proteica é causada pela interação de proteínas com espécies reativas de oxigênio (radical hidroxila, O_2^- , peróxido de hidrogênio, ozônio) e pode causar fragmentação da cadeia polipeptídica, formação de ligações cruzadas entre proteínas e modificação de cadeias laterais de aminoácidos para derivados de hidroxil e carbonil (FAGAN et al., 1999). Os processos de senescência celular podem ser exacerbados quando, simultaneamente, há formação de AGEs e o estresse oxidativo (Figura 2). O malondialdedo (MDA), produto da peroxidação lipídica, pode reagir com o ácido glicosilamino e com os primeiros intermediários da reação de Maillard, produzindo

derivados altamente lesivos à ligação cruzada de proteínas e envelhecimento celular (GOMEZSANCHEZ et al, 1992; HIPKISS et al., 1998).

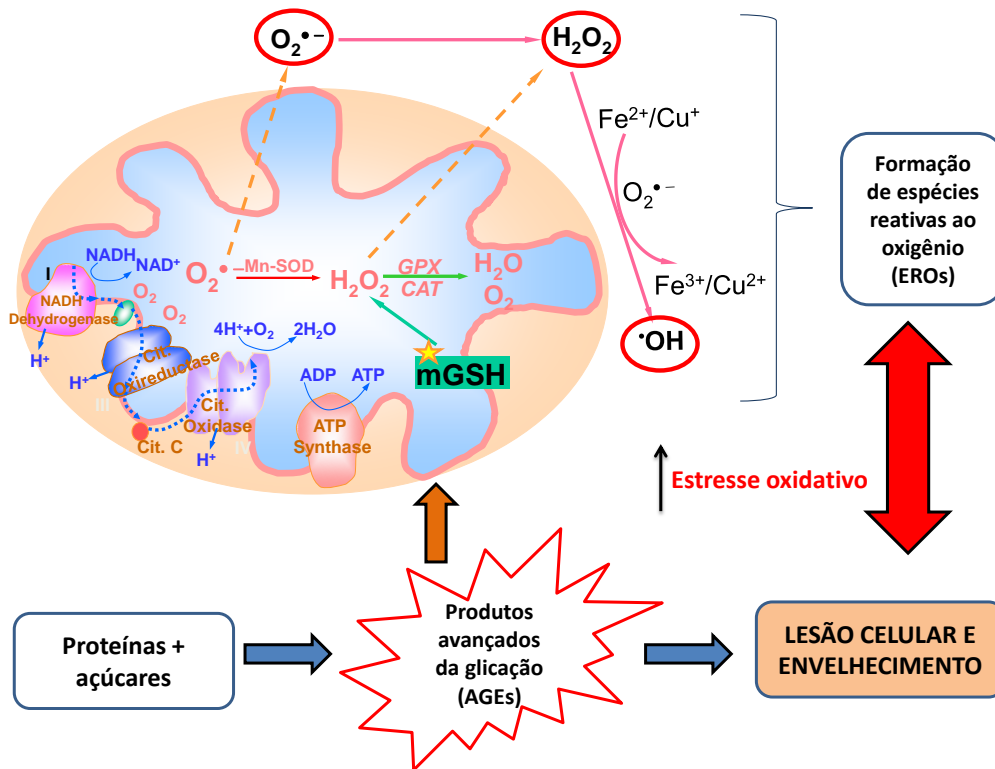


Figura 2 - Interações entre a glicação e estresse oxidativo na mitocôndria celular (Imagem própria, 2017)

Em particular, o espermatozoide é bastante susceptível ao estresse oxidativo, pois possui volume citoplasmático extremamente reduzido e, conseqüentemente, baixa capacidade antioxidante citoplasmática, além de possuir alta quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (mais facilmente oxidados) em sua membrana plasmática. Portanto, o estresse oxidativo pode causar danos às diferentes estruturas espermáticas, como membrana plasmática e acrossomal, mitocôndria e DNA espermático, sendo que o espermatozoide não possui capacidade de restauração, por deficiência de enzimas citoplasmáticas reparadoras (VERNET et al., 2004; NICHI et al., 2007; AGARWAL et al., 2014).

A oxidação de proteínas, por influência das espécies reativas ao oxigênio, também está envolvida no envelhecimento biológico, por meio da alteração de diversas enzimas metabólicas (FAGAN et al., 1999). Hellwig e Henle (2014) destacaram a relação entre o aumento do estresse oxidativo e o acúmulo de AGEs nas proteínas mitocondriais. A mitocôndria participa de diversos processos celulares,

incluindo a produção de ATP pela fosforilação oxidativa (BENKHALIFA et al., 2014). Segundo Amaral et al. (2013) e Edeas e Weissing (2013), a disfunção mitocondrial tem sido associada a diversas desordens, incluindo infertilidade e envelhecimento. Ainda, diferentes teorias destacam a mitocôndria como papel principal nos eventos celulares relacionados ao envelhecimento.

2.2. Função mitocondrial

De acordo com Benkhaifa e colaboradores (2014), diferentes teorias colocam a mitocôndria em papel central nos eventos celulares relacionados ao envelhecimento, pelo acúmulo de espécies reativas ao oxigênio e danos oxidativos a células e tecidos. Ainda, defeitos mitocondriais causam desordens fisiopatológicas, incluindo infertilidade e patologias reprodutivas. Amaral e colaboradores (2013) relatam que as características mais notáveis em uma célula senil são alterações mitocondriais. As mitocôndrias envelhecidas exibem deterioração estrutural, variando de inchaço e perda de cristais para destruição completa e homogeneização da matriz e membranas mitocondriais, resultando na formação de material amorfo.

A síntese de ATP nas mitocôndrias ocorre através do acoplamento de duas reações, o transporte de elétrons e a fosforilação, como consequência do gradiente de prótons. A força motora do próton criada na membrana interna também influencia a produção mitocondrial de EROs, e o desacoplamento leve causado pela ativação de proteínas desacopladoras (UCPs) pode diminuir esta força motriz do próton, atenuar a produção de EROs mitocondrial e proteger contra danos celulares relacionados aos EROs (MOOKERJEE et al., 2010).

É importante ressaltar que a teoria do estresse oxidativo não exclui outros fatores envolvidos no processo de envelhecimento. Parece claro que uma abordagem multifatorial deve ser reconhecida, uma vez que é extremamente improvável que uma única linha de pesquisa forneça resultados conclusivos neste campo (AMARAL et al., 2013). A função mitocondrial dos espermatozoides também pode sofrer outras alterações como, por exemplo, influenciada pela presença da gota citoplasmática proximal. De acordo com Angrimani et al. (2015), a mitocôndria é a principal fonte de energia para a motilidade e homeostase espermática, por meio

da fosforilação oxidativa. Porém, a gota citoplasmática é constituída por diversos substratos, tais como substâncias envolvidas na produção energética, incluindo enzimas metabólicas responsáveis pela catalisação da glicólise anaeróbica (YUAN et al., 2013), podendo haver interferência da gota citoplasmática proximal na funcionalidade mitocondrial.

Ainda, Suzuki-Toyota e colaboradores (2010) relatam que a passagem da gota citoplasmática pela membrana mitocondrial durante a maturação espermática acarreta em diversas mudanças, tais como estreitamento do espaço entre a membrana plasmática e as membranas mitocondriais externas, aparecimento de filamentos finos que reticulam as duas membranas acima e abaixo da gota e alterações no arranjo de partículas intramembranas (IMPs) na membrana plasmática na peça central.

2.3. Alterações reprodutivas no envelhecimento

Mudanças no sistema reprodutivo relacionadas à idade incluem aspectos funcionais, desde desregulação do eixo hipotálamo-pituitária-gonadal e interação local autócrina e parácrina, até efeito no epitélio celular testicular, flacidez na arquitetura testicular e espermatogênese, e finalmente, redução na secreção de testosterona e diminuição da função espermática (KATIB et al, 2014). Ainda segundo este último autor, o envelhecimento predispõe ao estresse oxidativo e ao aumento dos danos oxidativos nos ácidos nucléicos celulares e, em adição, ao impedimento da espermatogênese e função espermática, causas comuns de infertilidade em homens.

Segundo Amaral e colaboradores (2013), um dos aspectos mais marcantes do envelhecimento reprodutivo masculino no homem é o gradual e progressivo declínio dos níveis de testosterona. Em adição, estudos em homens senis mostraram significativa diminuição nos níveis de testosterona e seus precursores (PIRKE et al., 1980 e FELDMAN et al., 2002), assim como nos níveis de estrógeno (FELDMAN et al., 2002). Tais reduções são frequentemente associadas ao decréscimo do número de células de Leydig no parênquima testicular, diminuição da perfusão testicular,

distúrbios no ritmo diurno de GnRH e secreção de gonadotrofina coriônica (HAMMAR, 1985; FERRINI e BARRETT-CONNOR, 1998; MORLEY et al., 1997).

Para que a espermatogênese seja desencadeada, um ambiente hormonal adequado é necessário, incluindo a testosterona para o desenvolvimento das espermatogônias; LH para a produção e secreção da testosterona pelas células de Leydig e estrógeno proveniente da conversão de testosterona nas células de Sertoli por ação da aromatase (SILVA e CARVALHO, 2011). Mais especificamente em relação à produção espermática no homem, a maior parte das evidências sugerem que o aumento da idade está associado ao declínio no volume de sêmen, motilidade espermática e quantidade de espermatozoides morfológicamente normais, mas não à concentração de espermatozoides (KIDD et al., 2001 e SARTORIUS e NIESCHLAG, 2010). Outros estudos também revelam aumento da fragmentação de DNA, reduzida compactação da cromatina (PLASTIRA, et al., 2007) e cinemática alterada (SLOTTER et al., 2006). De fato, dados humanos e animais sugerem que a paternidade em homens idosos está associada ao maior risco de perda gestacional ou distúrbios genéticos na prole, causado por aneuploidias cromossômicas sexuais ou anormalidades estruturais do espermatozoide (SLOTTER et al., 2004; TEMPLADO et al., 2011).

2.4. Criopreservação seminal e os efeitos no espermatozoide

A estratégia global para manter a viabilidade reprodutiva dos animais é a criopreservação seminal, por manter a habilidade fecundante do espermatozoide após processamento em baixas temperaturas seguido da descongelação. Na rotina prática da criopreservação do sêmen canino, nota-se que o material proveniente de animais idosos possui menor congelabilidade e maior susceptibilidade aos danos morfológicos da criopreservação. A perda da qualidade espermática no processo de criopreservação é, possivelmente, relacionada ao ataque das espécies reativas ao oxigênio (EROs), causadoras do estresse oxidativo (IRVINE et al., 2000) e à maior formação de AGEs.

Para que o objetivo final da criopreservação da célula espermática seja mantido (habilidade fecundante), o espermatozoide deve apresentar, após o

descongelamento: metabolismo preservado, motilidade progressiva, DNA íntegro, acrossoma intacto e integridade de membrana plasmática. Porém, como descrito por Barbas e Mascarenhas (2009), a criopreservação dos espermatozoides induz a formação de espécies reativas de oxigênio, bem como declínio na motilidade, viabilidade e progressão no trato reprodutivo feminino, causando, por fim, redução na fertilidade. Em adição às modificações inerentes à senescência promovidas pelas AGEs e EROs, teoriza-se que a congelação do sêmen possa ser um agravante maior à perda da qualidade espermática, por vezes, inviabilizando o procedimento para reprodutores senis (BARBAS e MASCARENHAS, 2009).

Com o intuito de preservar a capacidade reprodutiva de indivíduos idosos ou portadores de afecções reprodutivas da senescência, o desenvolvimento de novas terapias surge como possibilidade nos estudos em andrologia. O emprego de terapias relativas ao envelhecimento poderá, ademais, contribuir para o melhor desempenho dos animais senis em biotecnologias reprodutivas, tais como a criopreservação seminal. O interesse de proprietários e criadores de cães pela congelação do sêmen transformou tal biotécnica em recurso amplamente utilizado em clínicas reprodutivas, especialmente com o objetivo de armazenamento do material genético de reprodutores de alto valor e de animais com elevada estima afetiva.

Hipótese

3. HIPÓTESE

O sêmen de cães senis apresenta concentração elevada dos produtos avançados de glicação (AGEs), causando, portanto, maiores níveis de estresse oxidativo (Figura 3). A formação de AGEs e estresse oxidativo na senescência determina danos celulares e maior perda na qualidade espermática após a criopreservação seminal (Figura 3).

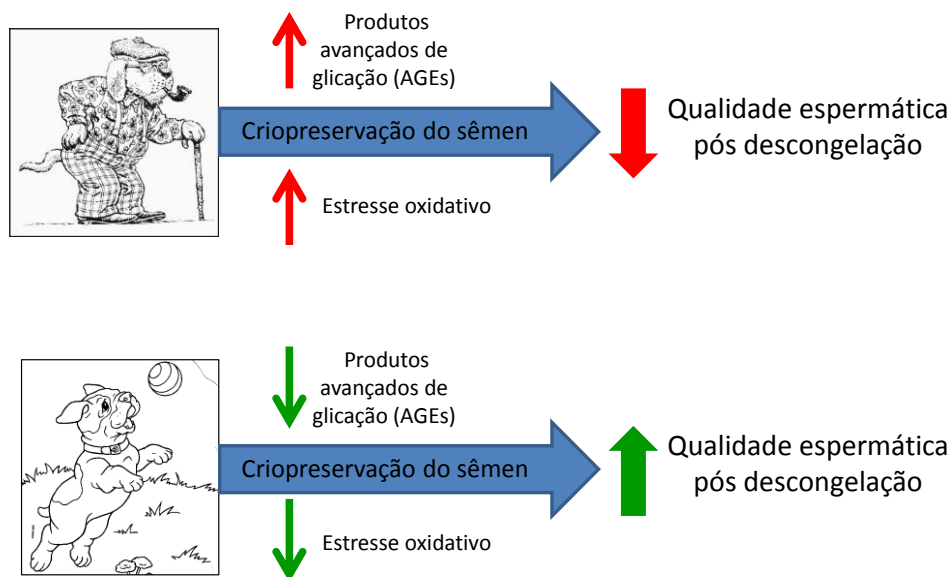


Figura 3 - Modelo hipotético gráfico do presente experimento (Imagem própria, 2017).

Objetivos

4. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

- Comparar:
 - ✓ A qualidade seminal entre cães jovens e senis, por análise dos atributos espermáticos morfo-funcionais;
 - ✓ Os níveis de estresse oxidativo, AGEs e oxidação de proteínas no sêmen de cães jovens e senis;
 - ✓ As diferenças de congelabilidade seminal entre cães jovens e senis.

Material e Métodos

5. MATERIAL E MÉTODOS

O presente projeto foi realizado obedecendo às normas estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), sob protocolo nº 7045270115.

5.1. Animais e grupos experimentais

Foram selecionados 22 cães, alocados em dois grupos experimentais de acordo com a idade: Grupo Jovem (n=11) e Grupo Senil (n=11). Os grupos foram adicionalmente subdivididos em Grupo Sêmen Fresco e Grupo Sêmen Criopreservado. A divisão etária foi realizada de acordo com o porte dos animais, sendo os cães senis de porte pequeno partir de 8 anos, de porte médio a partir de 7 anos e de porte grande a partir de 6 anos (BELLOWS et al., 2015), enquanto os cães jovens, independentemente do porte, foram considerados entre 1 e 5 anos de idade, conforme tabela abaixo:

Tabela 1 - Animais alocados nos grupos experimentais e a respectiva raça, porte, peso e idade. São Paulo, 2017

CÃO	GRUPO	RAÇA	PORTE	PESO (kg)	IDADE (anos)
1	Jovem	Lhasa Apso	Pequeno	7	5
2	Jovem	Boston Terrier	Pequeno	6	3
3	Jovem	Boston Terrier	Pequeno	7,3	1
4	Jovem	Boston Terrier	Pequeno	6,2	3
5	Jovem	Poodle Toy	Pequeno	2,2	3
MÉDIA				5,74	3
6	Jovem	SRD	Médio	21,6	1
7	Jovem	Chow Chow	Médio	25	1
8	Jovem	Chow Chow	Médio	27	3
MÉDIA				24,53	1,67
9	Jovem	Cane Corso	Grande	52	1
10	Jovem	Dobermann	Grande	40	2

11	Jovem	Schinauzer Gigante	Grande	48	4
MÉDIA				46,67	2,33
12	Senil	Pastor de Shetland	Pequeno	11,7	8
13	Senil	Boston Terrier	Pequeno	5,7	8
14	Senil	Poodle Toy	Pequeno	2	13
15	Senil	Cocker Spaniel Inglês	Pequeno	12	10
MÉDIA				7,85	9,75
16	Senil	SRD	Médio	24	12
17	Senil	Chow Chow	Médio	23,5	7
18	Senil	Chow Chow	Médio	23	9
19	Senil	Chow Chow	Médio	29	7
MÉDIA				24,875	8,75
20	Senil	SRD	Grande	32,2	10
21	Senil	Labrador	Grande	46	8
22	Senil	Cane Corso	Grande	49,5	7
MÉDIA				42,57	8,33

Os critérios de exclusão adotados referem-se ao monorquidismo e criptorquidismo uni ou bilateral, doenças da próstata tais como prostatite, neoplasias de próstata e hiperplasia prostática benigna e uso de medicamentos tais como qualquer tipo de hormônio ou corticoides (anti-inflamatórios esteroidais). Todos os animais apresentavam manejo alimentar semelhante, à base de ração comercial para cães.

No intuito de obter amostras seminais fidedignas e homogêneas, foi efetuada colheita prévia de sêmen 15 dias anteriores ao processamento das amostras, para renovação epididimária dos espermatozoides. Nesta mesma data, os animais também foram submetidos à aplicação de GnRH (Prorelin® – Buserelin 4 µg/mL) por via intramuscular na dose de 0,2 µg/kg e após 1 hora, uma amostra de sangue foi colhida por punção da veia cefálica ou jugular, direita ou esquerda, para separação do soro sanguíneo, utilizado para dosagem de testosterona e estrógeno (ROMERO et al., 2011).

Para as amostras experimentais, o sêmen foi colhido por manipulação digital do pênis e, então, uma alíquota foi imediatamente analisada (sêmen fresco), enquanto o restante foi submetido a protocolo de criopreservação (sêmen criopreservado). Para o Subgrupo Sêmen Fresco, as amostras foram imediatamente submetidas a avaliações espermáticas, estresse oxidativo lipídico e proteico e dosagem de AGEs. Para o Subgrupo Sêmen Criopreservado, as amostras foram

submetidas ao protocolo de congelação em uma etapa (BRITO et al., 2017), o qual consistiu em centrifugação da amostra a 800 xg por 5 minutos, retirada do sobrenadante, adição de diluidor Tris-gema-citrato contendo 5% de glicerol (Anexo 1) a 37°C em volume suficiente para atingir a concentração final de 200×10^6 espermatozoides/mL de diluidor. Os tubos com as amostras diluídas a 37°C foram colocados em beakers com aproximadamente 200 mL de água à mesma temperatura e levados à geladeira a 5°C até que atingissem tal temperatura, mantendo-se o controle por meio de um termômetro. Após o período de refrigeração, a mistura foi envasada em palhetas de 0,5 mL e lacradas com álcool polivinílico. As palhetas foram expostas ao vapor de nitrogênio, à altura de 4 cm da coluna líquida, durante 20 minutos e, em seguida, imersas em nitrogênio líquido a temperatura de -196°C. Após, no mínimo, 1 semana, as amostras foram descongeladas a 37°C por 30 segundos e foram avaliadas quanto aos atributos espermáticos, estresse oxidativo lipídico e proteico e dosagem de AGEs.

5.2. Análise do poder de teste

A análise do poder de teste foi realizada através do aplicativo SAS Power and Sample Size 12 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA), utilizando valores de médias e desvios padrão de algumas variáveis experimentais. A partir de amostras provenientes dos grupos Jovem e Senil, foram selecionadas as variáveis de defeitos espermáticos totais, porcentagem de gota proximal e linearidade dos espermatozoides. As análises mostraram um poder de teste acima de 0,80, demonstrando que o número de animais assegura o valor científico do presente experimento.

Tabela 2 - Poder do Teste e respectivas unidades experimentais (n) nas comparações entre os grupos experimentais (Jovem e Senil) para as variáveis de defeitos espermáticos totais, porcentagem de gota proximal e linearidade dos espermatozoides. São Paulo, 2017

	Defeitos totais		Gota proximal		Linearidade	
	n	Poder do Teste	n	Poder do Teste	n	Poder do Teste
Jovem	11	>0,99	11	>0,99	11	0,82
Senil	11	>0,99	11	>0,99	11	0,82

5.3 Avaliação da libido

Para a colheita de sêmen, foi utilizado *swab* de fêmea em cio (proestro ou estro) para estimulação da libido. Assim, a libido foi classificada em graus de 0 a 3, sendo considerado 0: a total falha de ereção do pênis e interesse pela fêmea; 1: interesse transitório pela fêmea, mas sem ereção durante a manipulação do pênis e prepúcio; 2: interesse sexual constante, e ereção parcial da glândula do pênis durante a massagem prepucial; 3: rápida ereção e movimentos pélvicos durante a colheita.

5.4 Avaliação seminal

As três frações ejaculatórias (frações 1, 2 e 3) foram diferenciadas no momento da colheita por inspeção visual e apenas a fração rica em espermatozoides foi colhida. A fração espermática foi avaliada quanto ao volume (utilizando tubo graduado), coloração e aspecto (graduado de 1 a 3 de acordo com a opacidade da amostra) e, então, destinada às análises morfológicas e funcionais dos espermatozoides. Já a terceira fração, correspondente ao fluido prostático, foi colhida separadamente e acondicionada em microtubos plásticos a -20°C , para posterior processamento.

5.4.1. Exames imediatos (*análise computadorizada da motilidade e concentração espermática*)

A concentração espermática foi avaliada em câmara de Neubauer, sob microscopia óptica. Para tanto, os espermatozoides foram diluídos em solução de formol salino e azul de metileno na diluição 1:200. O resultado foi obtido em milhões de espermatozoides por mL.

A avaliação da motilidade espermática foi realizada utilizando-se a análise computadorizada do sêmen (Computer Assisted Sperm Analysis - CASA; Hamilton-

Thorne Ivos 12.3). Desta forma, foram observados diferentes padrões de motilidade do sêmen, segundo Verstegen et al. (2002): porcentagem de espermatozoides móveis e progressivos, velocidade curvilínea (VCL- $\mu\text{m/s}$), velocidade linear progressiva (VSL- $\mu\text{m/s}$), velocidade média da trajetória (VAP- $\mu\text{m/s}$), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH - μm), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF- Hz), retilinearidade (STR - %), linearidade (LIN - %) e porcentagem de espermatozoides rápidos, em velocidade média, baixa e estáticos. Para a avaliação, dez microlitros de cada amostra seminal foram depositados entre lâmina comum e lamínula previamente aquecidas a 37°C em placa aquecida. Sete campos foram selecionados aleatoriamente e avaliados quanto à motilidade dos espermatozoides. Em seguida, o resultado foi calculado, em porcentagem, com a média dos sete campos avaliados. Utilizou-se o *setup* para cães, previamente estabelecido pelo aparelho, conforme imagem abaixo:

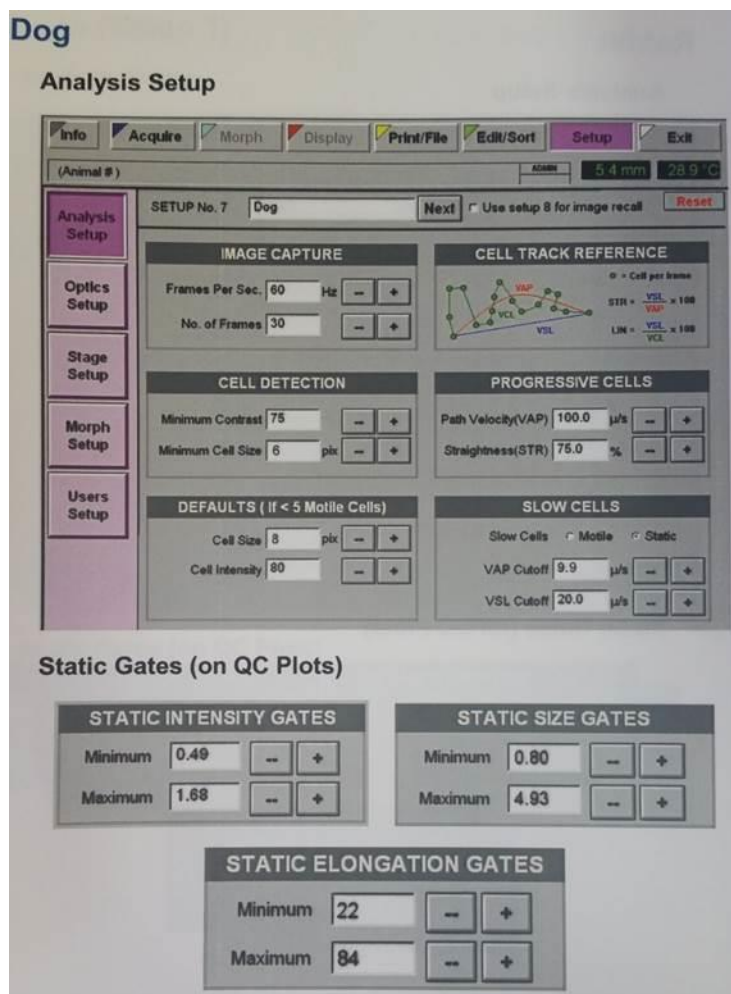


Figura 4 - *Setup* do aparelho de análise automatizada da motilidade espermática para o sêmen da espécie canina (Imagem própria, 2017).

5.4.2. Testes espermáticos funcionais e morfológicos (morfologia espermática, integridade de membrana plasmática e membrana acrossomal, atividade mitocondrial e fragmentação de DNA)

Para a avaliação da morfologia espermática, foi utilizada a técnica de câmara úmida, sob diluição do sêmen em formol salino na proporção de 1:3 (10 µL de amostra em 20 µL de formol salino). Posteriormente, 5 µL desta solução foi depositada entre lâmina comum e lamínula e avaliada em microscópio de luz transmitida, sob objetiva de imersão (Nikon, Eclipse E200), mediante a contagem de 200 espermatozoides. Os espermatozoides foram classificados em normais, com defeitos menores ou maiores, expressos em porcentagem (%), assim como o detalhamento específico da presença de gota citoplasmática proximal ou distal (FRESHMAN, 2002).

Para a avaliação da integridade da membrana plasmática, foi realizada a coloração de eosina/nigrosina, possibilitando a diferenciação das células com alterações de permeabilidade da membrana plasmática. Em lâmina pré-aquecida a 37°C, 5 µL da amostra espermática e 5 µL do corante eosina/nigrosina foram depositados para a confecção do esfregaço. A lâmina foi analisada em microscópio de luz transmitida, sob objetiva de imersão (Nikon, Eclipse E200), mediante a contagem de 200 espermatozoides (BARTH e OKO, 1989). Os resultados foram expressos em porcentagem.

A coloração de Fast-Green/Rosa-Bengala foi realizada para avaliação da integridade de membrana acrossomal dos espermatozoides. O esfregaço espermático foi realizado utilizando 5 µL da amostra e 5 µL do corante Fast-Green/Rosa-Bengala em lâmina pré aquecida a 37°C e analisado em microscópio de luz transmitida sob objetiva de imersão (Nikon, Eclipse E200) (POPE et al., 1991). Após contagem de 200 espermatozoides, os resultados foram expressos em porcentagem.

Com o objetivo de avaliar a atividade mitocondrial dos espermatozoides, foi utilizada a técnica citoquímica da 3,3'-diaminobenzidina (DAB), a qual categoriza os espermatozoides em quatro classes: alta (DAB – Classe 1), média (DAB – Classe 2), baixa (DAB – Classe 3) e ausência de atividade mitocondrial (DAB – Classe 4) (HRUDKA, 1987). Para tanto, uma alíquota da amostra foi incubada a 37°C por 1

hora com a DAB na proporção de 1:1 (20 µL de amostra : 20 µL de DAB). Após este período, foram feitos esfregaços das amostras em lâminas de vidro com posterior fixação em formol 10% por 15 minutos. A leitura transcorreu em microscópio óptico, sob objetiva de imersão (100x), com contagem de 200 espermatozoides e os resultados expressos em porcentagem.

Para análise da integridade do DNA espermático, foi utilizada a técnica de coloração do azul de toluidina (FLORES et al., 2016). Desta forma, os esfregaços de sêmen foram fixados na solução álcool 96% e acetona (1:1) a 4°C por 30 minutos. Em seguida, os esfregaços secaram por 30 minutos e só então, introduzidos em solução ácida de HCl (0.1N) a 4°C por 5 minutos, para hidrólise celular. Então, as lâminas foram lavadas três vezes em água destilada por 2 minutos. Após a lavagem, as lâminas foram coradas em solução de azul de toluidina (0,05%) por 20 minutos. Por fim, as lâminas foram lavadas duas vezes em água destilada por dois minutos e após secagem em temperatura ambiente, a leitura foi realizada em microscópio de luz transmitida, sob objetiva de imersão (Nikon, Eclipse E200), com contagem de 200 espermatozoides e resultados expressos em porcentagem.

5.4.3. Análise por citometria de fluxo (integridade de membrana acrossomal e de membrana plasmática e potencial de membrana mitocondrial)

As amostras seminais foram analisadas pela técnica de citometria de fluxo, por meio do aparelho BD FACSCalibur (Becton Dickinson, East Rutherford, NJ, USA). Os espermatozoides foram corados com sondas fluorescentes de acordo com os objetivos de análise. Adotou-se a concentração de sêmen de 188.000 espermatozoides diluídos em 37,5 µL de TALP.

Para avaliar a integridade de membrana plasmática utilizou-se a sonda fluorescente de iodeto de propídio (PI), na concentração de 6 µM, diluído em 200 µL de TALP, o qual penetrou em células com alterações na permeabilidade da membrana plasmática, corando-as em vermelho (CELEGHINI et al., 2007). Para a avaliação da integridade acrossomal, utilizou-se 5 µL da sonda fluorescente aglutinina de *Psium sativum* conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA), na concentração de 100 µg/mL, diluído em 1995 µL de Azida Sódica 1%,

corando os acrossomos lesionados em verde (PETERSON et al., 1974). Desta forma, foram adicionados 11,2 µL de PI, na concentração 6 µM na solução de FITC-PSA em Azida Sódica 1%. Então, o volume de 188.000 espermatozoides diluídos em 37,5 µL de TALP, foi incubado a 37°C por 5 minutos, em 13 µL da solução de FITC-PI. Posteriormente, foram adicionados 300 µL de TALP para a amostra ser processada no aparelho de citometria de fluxo. Tal procedimento foi realizado com o intuito de obter o resultado combinado entre integridade de membrana plasmática e acrossomal, da mesma população de células. Ainda, utilizou-se os devidos controles para compensação das sondas separadamente.

O JC-1 (iodeto de 5,5',6,6' tetracloro 1,1,3,3' tetraetilbenzimidazolilcarbocianina) foi a sonda fluorescente de escolha para a avaliação do potencial mitocondrial dos espermatozoides, classificando-os em elevado potencial de membrana mitocondrial (fluorescência laranja), médio potencial de membrana mitocondrial (fluorescência laranja claro esverdeada) e baixo potencial (fluorescência verde). Para tal análise, foi adicionado 1 µL da sonda JC-1, na concentração de 50 µg/mL em 188.000 espermatozoides diluídos em 37,5 µL de TALP. As amostras foram incubadas a 37°C por 10 minutos e, então, 300 µL de TALP foram adicionados para, em seguida, a amostra ser processada no aparelho. Os espermatozoides foram separados em três populações, os que continham elevado potencial de membrana mitocondrial, médio potencial de membrana mitocondrial e baixo potencial de membrana mitocondrial.

Ainda, amostras sem corante (branco) foram utilizadas para a adequada separação dos espermatozoides no gráfico, impedindo a consideração de outras partículas.

5.4.4. Análise da Peroxidação Lipídica (TBARS), Oxidação de Proteínas, Dosagem de Produtos Avançados de Glicação (AGEs) e Concentração de proteínas

A avaliação da susceptibilidade ao estresse oxidativo foi realizada pelo teste desenvolvido por Ohkawa et al. (1979), comumente designado de TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico). Um milhão de espermatozoides

foram diluídos em volume suficiente de PBS para alcançar o volume total de 200 μL e então foi adicionado 50 μL de sulfato ferroso (4mM) e 50 μL de ascorbato de sódio (20 mM) por uma hora e meia à 37°C para que ocorresse a indução da peroxidação lipídica. Posteriormente, foram adicionados 600 μL de ácido tricloroacético 10% (TCA 10%, Sigma Aldrich®) a 5°C. Então, a amostra foi centrifugada na capacidade de rotação de 20.817 x g na centrífuga *Eppendorf 5810R*, durante 15 minutos a 5°C para que ocorra a precipitação das proteínas da amostra. Sequencialmente, alíquotas de 600 μL de sobrenadante foram transferidas para criotubos, nas quais foram adicionados 600 μL de ácido tiobarbitúrico 1% (TBA 1%, Sigma Aldrich®) e submetidas a 100°C durante 10 minutos. Em seguida, as amostras foram imersas em banho com gelo para interrupção da reação. Ao ocorrer a peroxidação lipídica, há formação de malondialdeído, substância reativa ao ácido tiobarbitúrico, a qual em contato com o TBA, apresenta coloração rósea. A mudança de coloração das amostras foi quantificada em espectrofotômetro (Ultrospec 3300 pro®) com comprimento de onda de 532 nanômetros. Sendo assim, a avaliação da susceptibilidade ao estresse oxidativo é expressa em nanogramas de TBARS por milhão de espermatozoides.

O protocolo utilizado para a avaliação da oxidação de proteínas seguiu aquele proposto por Odetti et al. (1996) e Levine et al. (1990), para os quais 100 μL do plasma seminal ou 20 milhões de espermatozoides diluídos em PBS em quantidade suficiente para volume final de 100 μL foram adicionados a 100 μL de Ácido Tricloroacético (TCA) 20%. Em seguida, a mistura foi centrifugada por 10 minutos a 20.817 *xg* e descartado o sobrenadante. Foi adicionado, então, 500 μL de 2,4 Dinitrofenilhidrazina (10 mM) nas amostras e 500 μL de HCl 2M nos respectivos brancos de cada amostra e ambos foram mantidos por 1 hora à 37°C, agitando a cada 15 minutos. Após, foi adicionado 500 μL de TCA 20%, centrifugado por 5 minutos a 20.817 *xg* e descartado o sobrenadante. Foi adicionado 1 mL de acetato de etila/etanol (1:1) e, após 10 minutos, a mistura foi centrifugada a 20.817 *xg*. Posteriormente, o pellet foi ressuspensionado em 2 mL de NaOH 1M e a absorbância máxima gerada foi lida entre 380 nm de comprimento de onda em espectrofotômetro (Ultrospec 3300 pro®).

A dosagem de Produtos Avançados de Glicação (AGEs) seguiu o protocolo proposto por Schmitt et al. (2005), para os quais as amostras de plasma seminal (2 mL) foram acondicionadas em cubetas de cristal, submetidas à leitura no aparelho

de espectrofluorometro Fluorolog 3 (Jobin Ivon®) excitadas no comprimento de onda de 330 nm. Os resultados são expressos em comprimento de onda (nm), diretamente proporcional à concentração de AGEs das amostras.

A dosagem de proteínas foi realizada de acordo com protocolo descrito por Lowry (LOWRY, 1951), para o qual 5 µL da amostra foram diluídos em 495 µL de NaOH 0,1N para, em seguida reagir com 2,5 mL de Reagente Alcalino de Cooper por 10 minutos em temperatura ambiente. Após 10 minutos, foi adicionado 250 µL de reagente de Folin diluído e as amostras foram imediatamente vortexadas e ficaram em descanso por 30 minutos em temperatura ambiente. As amostras foram submetidas à leitura em espectrofotômetro (Ultrospec 3300 pro®) em comprimento de onda de 660 nm. Os resultados foram expressos em mg de proteínas/ml.

5.5. Perfil hormonal

Após o teste de estimulação hormonal com GnRH, o soro obtido foi armazenado em microtubos de polipropileno (Eppendorf®) de 2 mL em freezer a -20°C. As dosagens hormonais foram realizadas com kits comerciais de radioimunoensaio para mensuração quantitativa de testosterona e estrógeno (Beckman Coulter ®), previamente validados para a espécie (KAWAKAMI et al., 2001; POLISCA et al., 2013). Para o hormônio estradiol, os coeficientes intra e inter ensaio encontram-se na tabela 3 e, para o hormônio testosterona, na tabela 4.

Tabela 3 - Coeficientes intra e inter ensaio para a dosagem de estradiol em soro sanguíneo. São Paulo, 2017

Ensaio	Coeficiente de variação intra ensaio baixo	Coeficiente de variação intra ensaio alto
1	7,15%	3,45%
2	7,56%	3,53%
Coeficiente de variação inter ensaio	2,67%	0,52%

Tabela 4 - Coeficiente intra ensaio para a dosagem de testosterona em soro sanguíneo. São Paulo, 2017*

Ensaio	Coeficiente de variação intra ensaio baixo
1	4,52%

*Houve somente um ponto de controle.

5.6. Análise estatística

Os dados foram avaliados de acordo com um fatorial 2X2, sendo os fatores: o grupo de idade (jovem vs. senil) e o congelamento do sêmen (fresco vs. congelado), pelo programa SAS System for Windows (SAS, 2000).

Pelo aplicativo Guided Data Analysis, os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos (distribuição normal) e homogeneidade das variâncias. Quando não obedeceram a estas premissas, foram transformados de acordo com sugestões do aplicativo (logaritmo na base 10 - $\text{Log}_{10}X$; Raiz quadrada - $\text{RQ } X$; Quadrado - X^2 , Arco seno – $\text{arcsin}(X)$; entre outras) e quando a normalidade não foi obtida, empregou-se, então, o procedimento NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica. Para as análises paramétricas foi utilizado o teste Least Significant Differences (LSD) para a comparação entre os grupos.

Para descrição dos resultados, foram empregadas as médias, seus respectivos erros padrões, intervalos de confiança e níveis de significância (p) dos dados originais, quando obedeceram às premissas; dos dados transformados, quando necessária a transformação; e dos dados analisados pela análise não paramétrica, quando não obedeceram às premissas e não houve transformações possíveis.

As variáveis resposta foram submetidas aos testes de correlação de Pearson e Spearman para variáveis paramétricas e não paramétricas, respectivamente. O nível de significância utilizado para rejeitar H_0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas entre os diferentes grupos.

5.7. Delineamento experimental

O presente experimento foi realizado de acordo com o delineamento apresentado na figura 5.

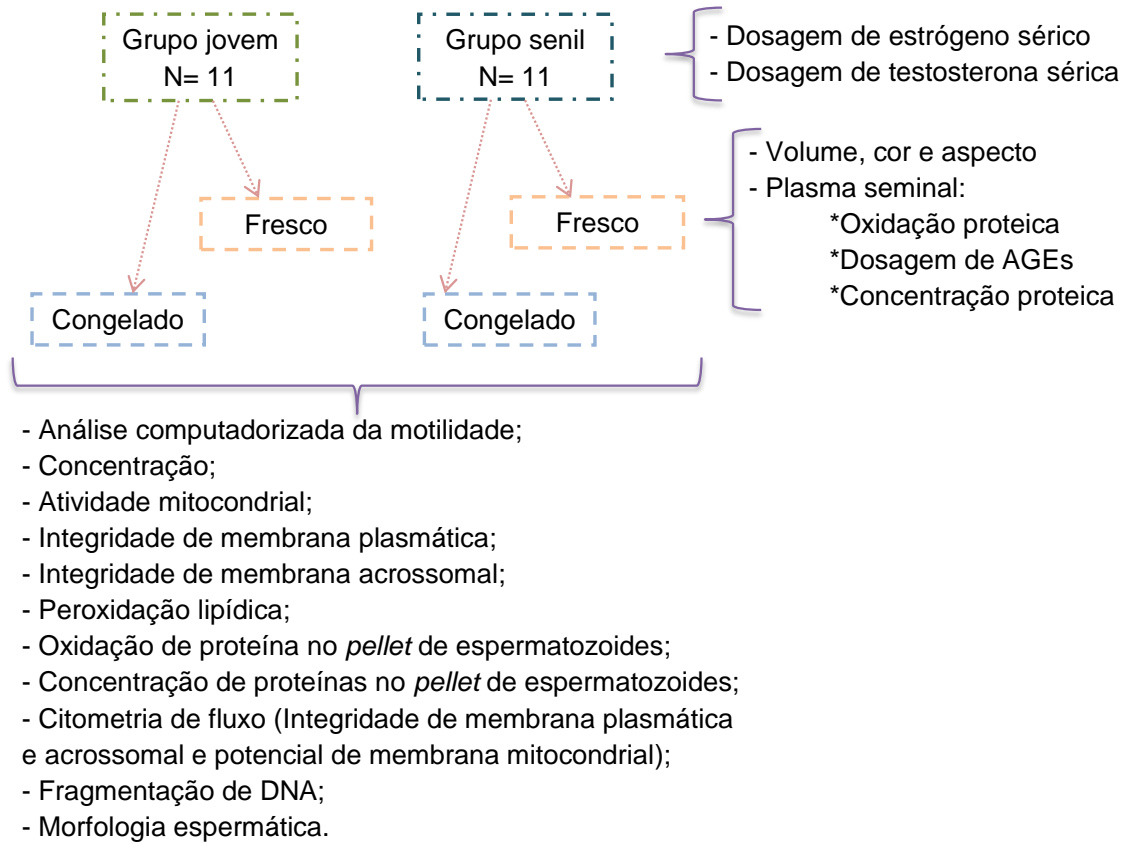


Figura 5 - Delineamento experimental (Imagem própria, 2017).

Resultados

6. RESULTADOS

6.1. Padronização de técnicas

6.1.1. Padronização da avaliação de oxidação de proteínas

O protocolo utilizado para a avaliação da oxidação de proteínas foi aquele proposto por Odetti et al. (1996) e Levine et al. (1990), com modificações. A referida padronização para o plasma seminal da espécie canina foi realizada com uma proteína conhecida (Albumina Sérica Bovina – BSA - Sigma®) e em concentração previamente determinada.

Para a padronização da técnica, 100 µL de Albumina Sérica Bovina nas concentrações de 0 mg/mL; 10 mg/mL; 20 mg/mL; 40 mg/mL e 80 mg/mL foram incubadas em 50 µL de peróxido de hidrogênio 1,14M a fim de induzir a oxidação das proteínas. Posteriormente, seguiu-se os procedimentos descritos para a técnica. A leitura foi feita em espectrometria à absorvância de 380nm.

Os resultados da padronização estão expressos na figura 6.

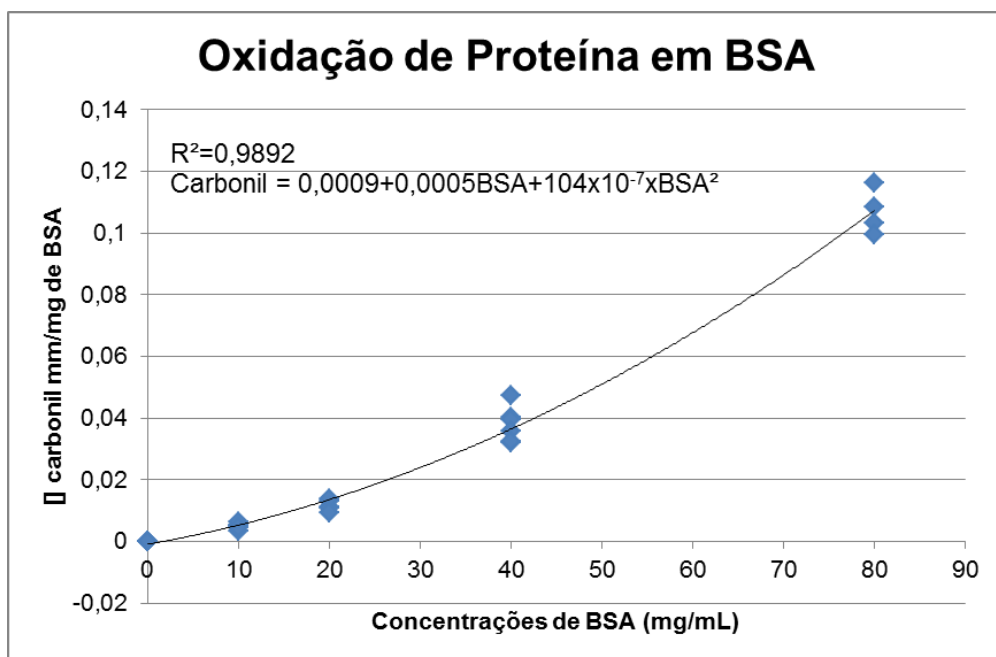


Figura 6 - Efeito de concentrações crescentes de BSA em peróxido de hidrogênio 1,14M para avaliação da técnica de oxidação de proteínas modificada.

O coeficiente de regressão linear (R^2) foi considerado alto (0,9892) e os resultados seguiram um padrão crescente de acordo com o aumento da indução oxidativa. Tais resultados demonstram adequada padronização da técnica para avaliação da oxidação proteica no plasma seminal de cão.

6.2. Avaliação da senescência reprodutiva nos parâmetros seminais de amostras frescas e criopreservadas

6.2.1. Análise das dosagens de testosterona e estrógeno

Para as dosagens de estrógeno e testosterona séricos, após indução com GnRH, não houve diferença entre os grupos (Tabela 5), embora houvesse tendência estatística ($p=0,07$) de superioridade das concentrações de testosterona para o Grupo Senil.

Tabela 5 – Concentração de testosterona e estrógeno séricos nos grupos Jovem e Senil. São Paulo, 2017

Variável	Jovem	Senil	p
Testosterona (ng/mL)	1,85±0,26	2,79±0,47	0,0734
Estrógeno (pg/mL)	3,58±0,79	6,60±1,54	0,1259

6.2.2. Análises seminais nos Grupos Jovem e Senil

À comparação entre os Grupos Jovem e Senil, apenas a variável libido apresentou diferença estatística, sendo que os cães jovens apresentaram maior escore de libido em comparação aos senis (Figura 6). As demais variáveis não apresentaram diferença estatística (Tabela 6).

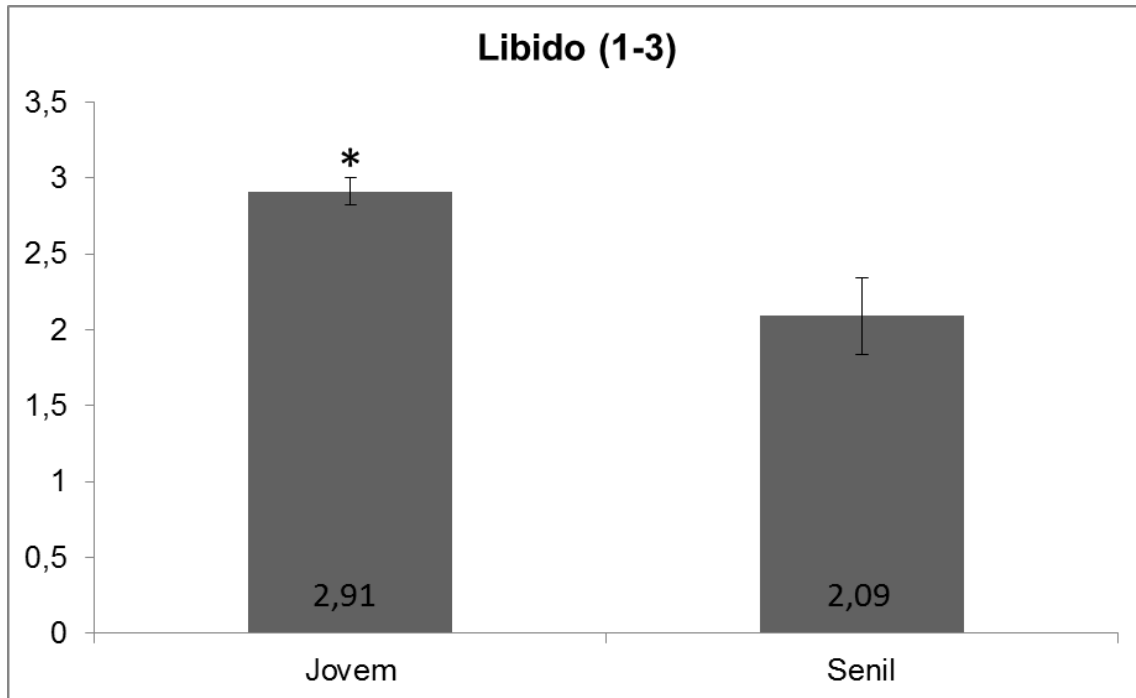


Figura 7 – Escore de libido (1-3) nos Grupos Jovem e Senil. * Indica diferença estatística entre grupos para $p=0,0071$.

Tabela 6 - Variáveis seminais nos Grupos Jovem e Senil.

Variável	Jovem	Senil	p
Volume do ejaculado (mL)	1,96±0,28	1,77±0,45	0,7231
Aspecto do ejaculado (1-3)	2,73±0,14	2,55±0,16	0,3996
Concentração (milhões de espermatozoides/mL)	605,45±110,82	465,45±93,44	0,3457
Concentração proteica no plasma seminal (ng/mL)	35,41±5,48	35,46±6,26	0,9957
Oxidação proteica no plasma seminal (mm de carbonil/mg de proteína)	0,02±0,005	0,01±0,005	0,4985
Produtos Avançados de Glicação no plasma seminal (nm)	396,70±0,56	396,25±0,83	0,6494

6.2.3. Análise seminal de acordo com os grupos experimentais (Jovem X Senil) e processamento do sêmen (Fresco X Descongelado)

Foi detectada interação estatística ($p<0,05$) entre a faixa etária dos cães (Jovem vs. Senil) e o processamento do sêmen (Fresco vs. Congelado) apenas para as variáveis de integridade de membrana acrossomal (esfregaço corado), lesão de

membrana plasmática com membrana acrossomal íntegra (citometria de fluxo), membranas plasmática e acrossomal íntegras (citometria de fluxo), alto potencial de membrana mitocondrial (citometria de fluxo), baixo potencial de membrana mitocondrial (citometria de fluxo) e oxidação de proteína no pellet de espermatozoides (Tabela 7).

Tabela 7 - Valores de probabilidade (p) para os efeitos principais Idade (Jovem e Senil) e Processamento (Fresco e Descongelado) e sua interação (Idade X Processamento) para as distintas variáveis seminais. São Paulo, 2017

Variável	Idade	Processamento	Idade X Processamento
Velocidade média da trajetória ($\mu\text{m/s}$)	0,0359	0,02	0,6674
Velocidade linear ($\mu\text{m/s}$)	0,0445	0,0084	0,7068
Velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s}$)	0,119	0,1147	0,7105
Amplitude de deslocamento lateral da cabeça (μm)	0,5284	0,0092	0,1609
Frequência de batimento flagelar cruzado (Hz)	0,2861	<0,0001	0,3352
Retilinearidade (%)	0,1799	0,1387	0,3682
Linearidade (%)	0,0504	0,0073	0,4101
Motilidade (%)	0,153	<0,0001	0,2892
Motilidade progressiva (%)	0,3667	<0,0001	0,5959
Motilidade em velocidade rápida (%)	0,3069	<0,0001	0,5465
Motilidade em velocidade média (%)	0,3738	0,1759	0,7694
Motilidade em baixa velocidade (%)	0,9358	0,5601	0,7389
Estáticos (%)	0,1999	<0,0001	0,8896
Defeitos espermáticos menores (%)	0,4358	0,8317	0,1475
Defeitos espermáticos maiores (%)	0,0083	0,9216	0,3309
Defeitos espermáticos totais (%)	0,0001	0,3176	0,2961
Gota proximal (%)	0,0137	0,3029	0,6486
Gota distal (%)	0,4104	0,7605	0,2924
Integridade de membrana plasmática (%)	0,9268	<0,0001	0,1608
Integridade de membrana acrossomal (%)	0,0048	<0,0001	0,0141

Alta atividade mitocondrial (%)	0,0089	0,0003	0,8522
Média atividade mitocondrial (%)	0,0006	<0,0001	0,8417
Baixa atividade mitocondrial (%)	0,3494	0,0053	0,3394
Atividade mitocondrial ausente (%)	0,2074	0,8172	0,8172
Lesão de membrana plasmática com integridade de membrana acrossomal (%)	0,1084	0,0909	0,0168
Lesão de membrana plasmática e acrossomal (%)	0,3126	0,001	0,3283
Membrana plasmática íntegra com lesão de membrana acrossomal (%)	0,4064	0,0079	0,1824
Membrana plasmática e acrossomal íntegras (%)	0,051	0,8584	0,0262
Alto potencial de membrana mitocondrial (%)	0,0822	0,0054	0,0093
Médio potencial de membrana mitocondrial (%)	0,8872	0,0004	0,7152
Baixo potencial de membrana mitocondrial (%)	0,0224	<0,0001	0,0019
Integridade de DNA (%)	0,8501	0,1709	0,2096
Concentração proteica no <i>pellet</i> de espermatozoide (ng/mL)	0,7355	<0,0001	0,4863
Oxidação proteica no <i>pellet</i> de espermatozoide (mm de carbonil/mg de proteína)	0,6436	0,3227	0,0461
Peroxidação lipídica (TBARS/milhão de espermatozoides)	0,4478	0,0029	0,3928

No sêmen fresco, comparando cães jovens e senis, foi possível observar maiores índices de integridade de membrana plasmática e acrossomal e menor integridade de membrana acrossomal com lesão de membrana plasmática nos cães senis (Figura 7), assim como menor porcentagem de espermatozoides com baixo potencial de membrana mitocondrial e maior porcentagem de espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial (Figura 8), avaliados por sondas

fluorescentes em citometria de fluxo. As demais variáveis não apresentaram diferença estatística (Tabela 8).

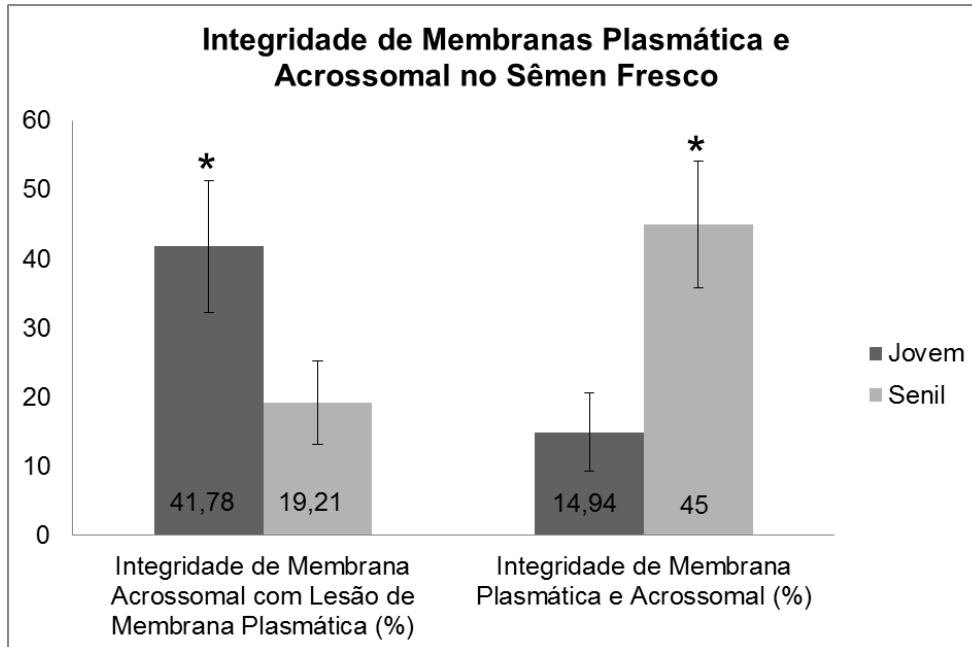


Figura 8 – Porcentagem de espermatozoides com integridade de membrana acrossomal e lesão de membrana plasmática e integridade de membrana plasmática e acrossomal, avaliados por sondas fluorescentes na citometria de fluxo no sêmen fresco dos Grupos Jovem e Senil. * Indica diferença estatística entre grupos para $p < 0,05$.

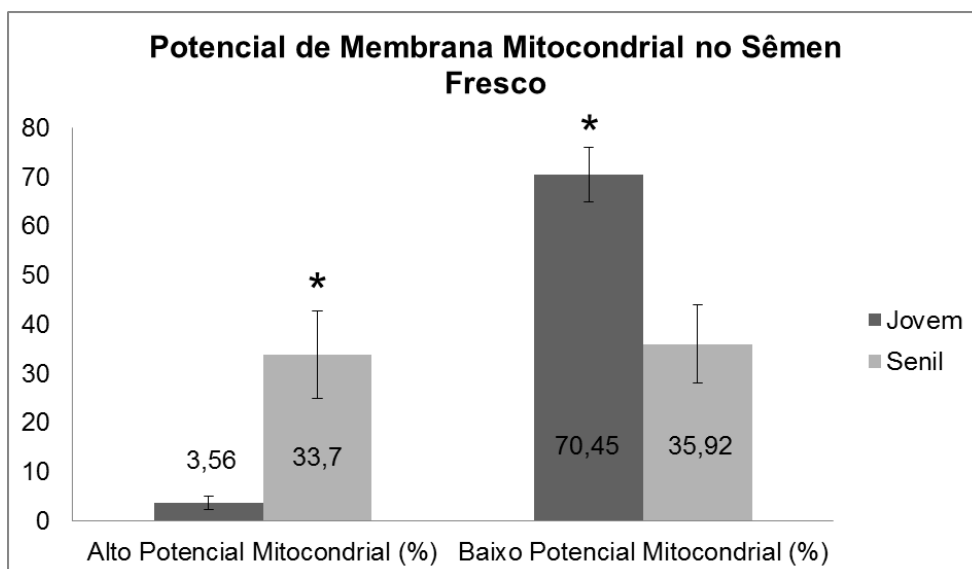


Figura 9 – Porcentagem de espermatozoides com alto e baixo potencial de membrana mitocondrial avaliados por sondas fluorescentes em citometria de fluxo no sêmen fresco dos Grupos Jovem e Senil. * Indica diferença estatística entre grupos para $p < 0,05$.

Tabela 8 - Variáveis de integridade de membrana acrossomal (esfregaço corado em DAB) e oxidação de proteína no pellet de espermatozoides para o sêmen fresco nos grupos Jovem e Senil. São Paulo, 2017

Variável	Jovem	Senil	p
Integridade de membrana acrossomal (%)	97,36±1,25	95,00±1,18	0,1677
Oxidação proteica no pellet de espermatozoide (mm de carbonil/mg de proteína)	0,00064±0,00029	0,00029±0,00012	0,2893

Considerando o sêmen descongelado, o Grupo Jovem apresentou maior integridade de membrana acrossomal (esfregaço corado em Fast Green / Rosa Bengala) em comparação ao Grupo Senil (Figura 9), enquanto as demais variáveis não apresentaram diferença estatística (Tabela 9).

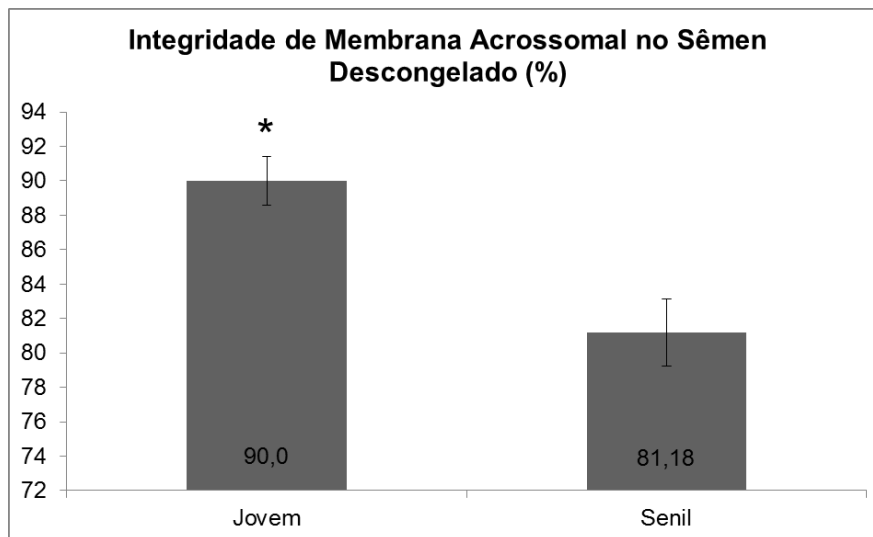


Figura 10 – Porcentagem de espermatozoides com integridade de membrana acrossomal por esfregaço corado em Fast Green / Rosa Bengala, no sêmen descongelado para os grupos Jovem e Senil. * Indica diferença estatística entre grupos para p=0,0014.

Tabela 9 - Variáveis seminais para o sêmen descongelado nos grupos Jovem e Senil. São Paulo, 2017

Variável	Jovem	Senil	p
Lesão de membrana plasmática com integridade de membrana acrossomal (%)	13,28±2,60	18,12±2,78	0,1406
Membrana plasmática e acrossomal íntegras (%)	24,24±4,58	20,57±3,40	0,842
Alto potencial de membrana mitocondrial (%)	10,02±4,56	5,28±1,79	0,893
Baixo potencial de membrana mitocondrial (%)	80,65±4,53	85,33±3,01	0,3861

Oxidação proteica no <i>pellet</i> de espermatozoide (mm de carbonil/mg de proteína)	0,00014±0,00004	0,0011±0,00078	0,1758
---	-----------------	----------------	--------

Para as amostras de cães jovens, o sêmen fresco apresentou maior integridade de membrana acrossomal (esfregaço corado em Fast Green / Rosa Bengala – Figura 10) e maior porcentagem de lesão de membrana plasmática com integridade de membrana acrossomal (Citometria de fluxo - Figura 11), comparando-se ao sêmen descongelado. As demais variáveis não apresentaram diferença estatística (Tabela 10).

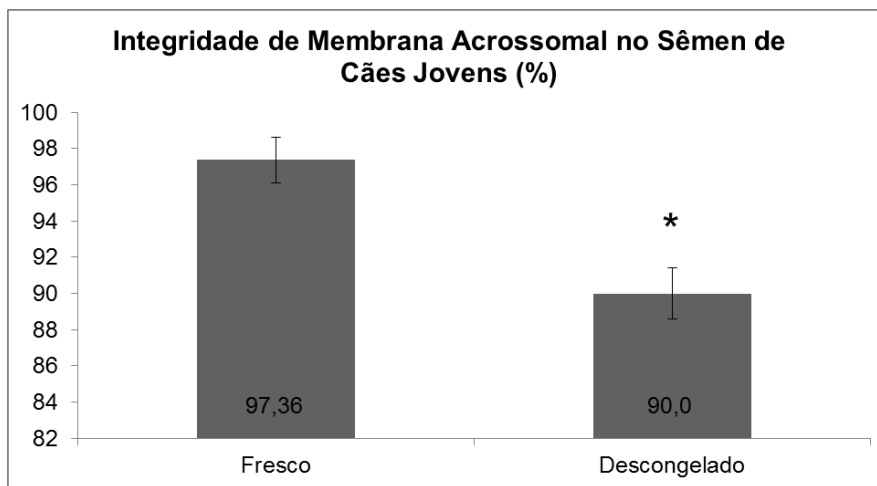


Figura 11 – Porcentagem de espermatozoides com integridade de membrana acrossomal por esfregaço corado em Fast Green / Rosa Bengala nos Grupos Fresco e Descongelado para cães jovens. * Indica diferença estatística entre grupos para $p=0,0007$.

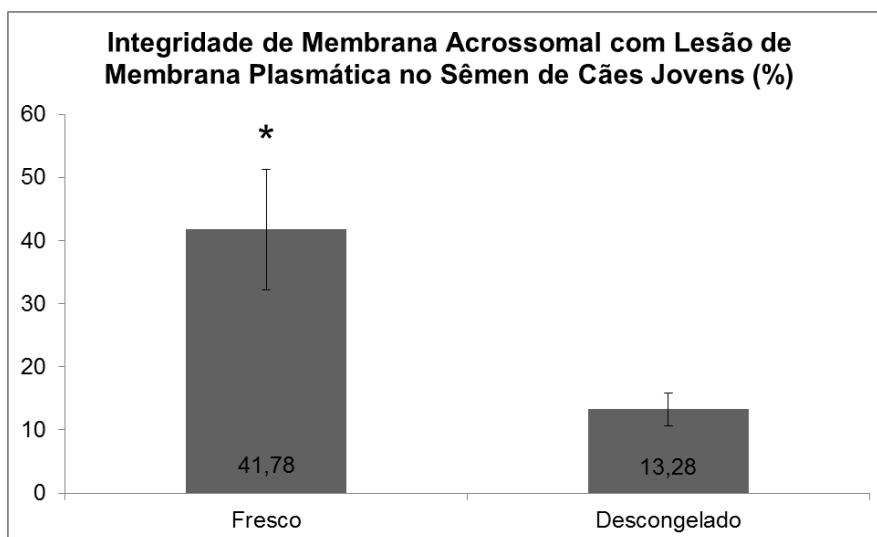


Figura 12 – Porcentagem de espermatozoides com integridade de membrana acrossomal e lesão de membrana plasmática nos grupos Fresco e Descongelado para cães jovens. * Indica diferença estatística entre grupos para $p=0,0036$.

Tabela 10 - Variáveis seminais nos grupos Fresco e Descongelado para cães jovens. São Paulo, 2017

Variável	Fresco	Descongelado	p
Membrana plasmática e acrossomal íntegras (%)	14,94±6,04	24,24±4,58	0,1965
Alto potencial de membrana mitocondrial (%)	3,56±1,42	10,02±4,56	0,9268
Baixo potencial mitocondrial (%)	70,45±5,55	80,65±4,53	0,1719
Oxidação proteica no <i>pellet</i> de espermatozoide (mm de carbonil/mg de proteína)	0,00064±0,00029	0,00014±0,00004	0,0504

Quanto ao sêmen de cães senis, houve maior integridade de membrana acrossomal (esfregaço corado em Fast Green / Rosa Bengala – Figura 12) e maior porcentagem de espermatozoides com integridade de membrana plasmática e acrossomal (Citometria de fluxo - Figura 13) no sêmen fresco em comparação ao descongelado, assim como maior porcentagem de espermatozoides com alto potencial mitocondrial e menor porcentagem de espermatozoides com baixo potencial mitocondrial (Figura 14). As demais variáveis não apresentaram diferença estatística (Tabela 11).

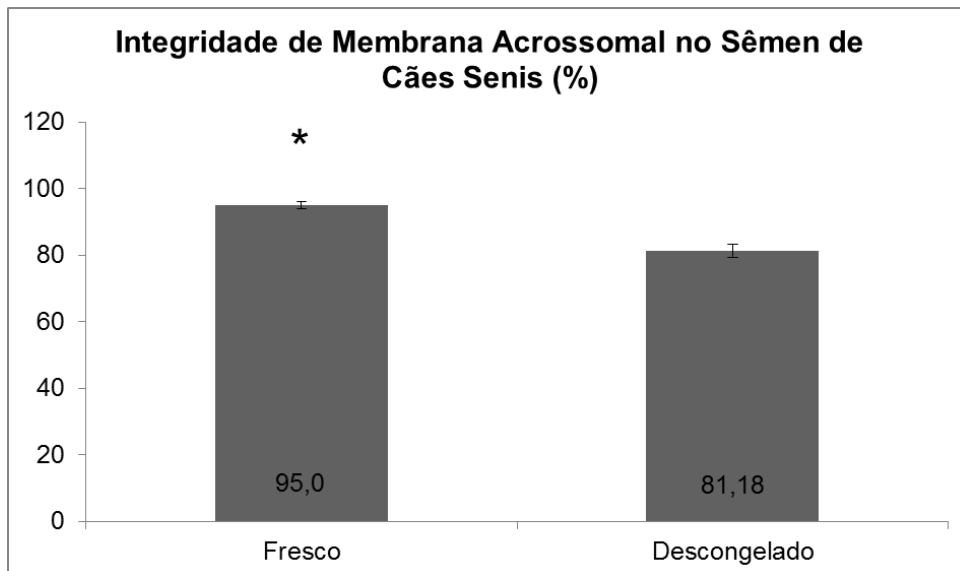


Figura 13 – Porcentagem de espermatozoides com integridade de membrana acrossomal por esfregaço corado em Fast Green / Rosa Bengala nos grupos Fresco e Descongelado para cães senis. * Indica diferença estatística entre grupos para $p < 0,0001$.

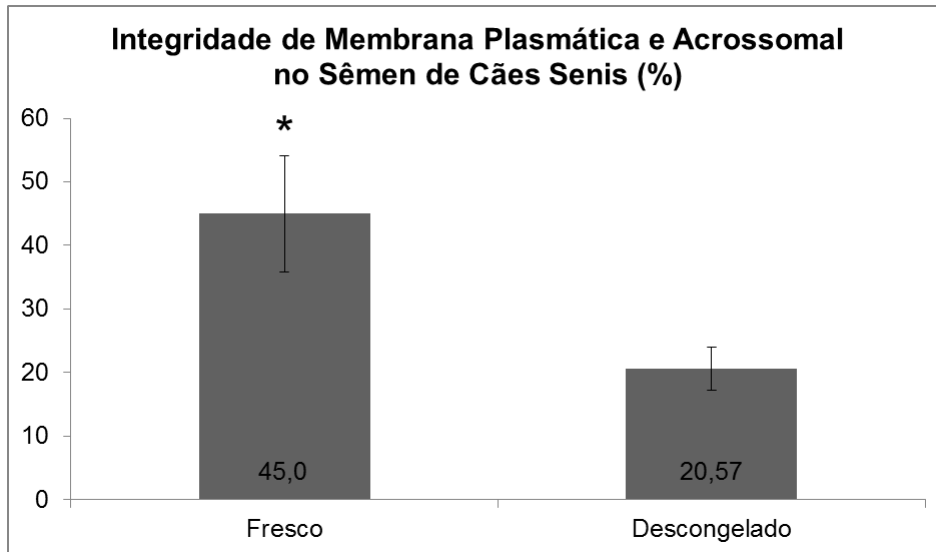


Figura 14 – Porcentagem de espermatozoides com integridade de membrana plasmática e acrossomal nos grupos Fresco e Descongelado para cães senis. * Indica diferença estatística entre grupos para $p=0,0316$.

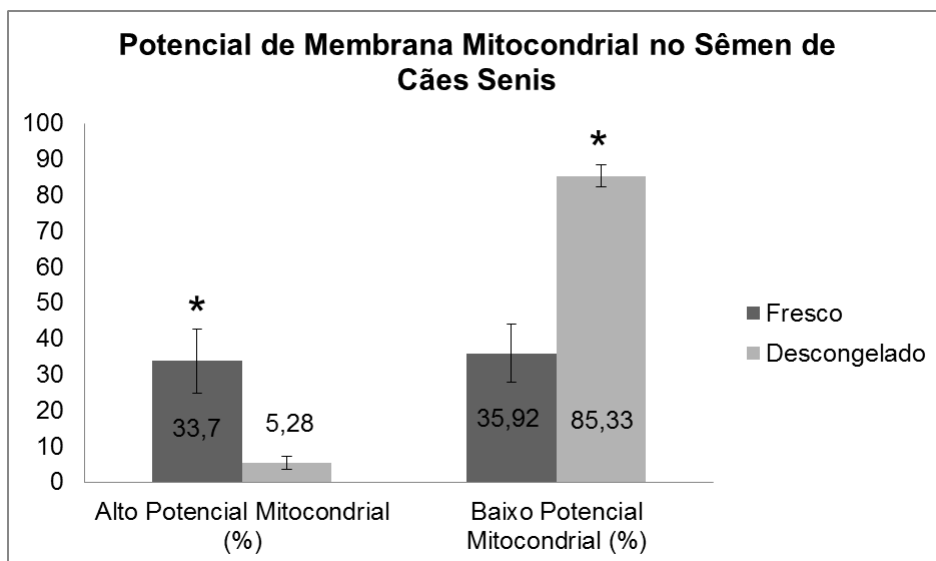


Figura 15 – Porcentagem de espermatozoides com alto e baixo potencial de membrana mitocondrial nos grupos Fresco e Descongelado para cães senis. * Indica diferença estatística entre grupos para $p<0,05$.

Tabela 11 - Variáveis seminais nos grupos Fresco e Descongelado de cães senis. São Paulo, 2017

Variável	Fresco	Descongelado	p
Lesão de membrana plasmática com integridade de membrana acrossomal (%)	19,21±5,66	18,12±2,78	0,474
Oxidação proteica no <i>pellet</i> de espermatozoide (mm de carbonil/mg de proteína)	0,00029±0,00012	0,0011±0,00078	0,5545

Na comparação entre os Grupos Jovem e Senil, o sêmen de cães jovens apresentou maior velocidade média da trajetória (VAP) e maior linearidade da motilidade (Figura 15), sem outras diferenças estatísticas para as avaliações dos parâmetros da motilidade realizados pelo CASA (Tabela 12).

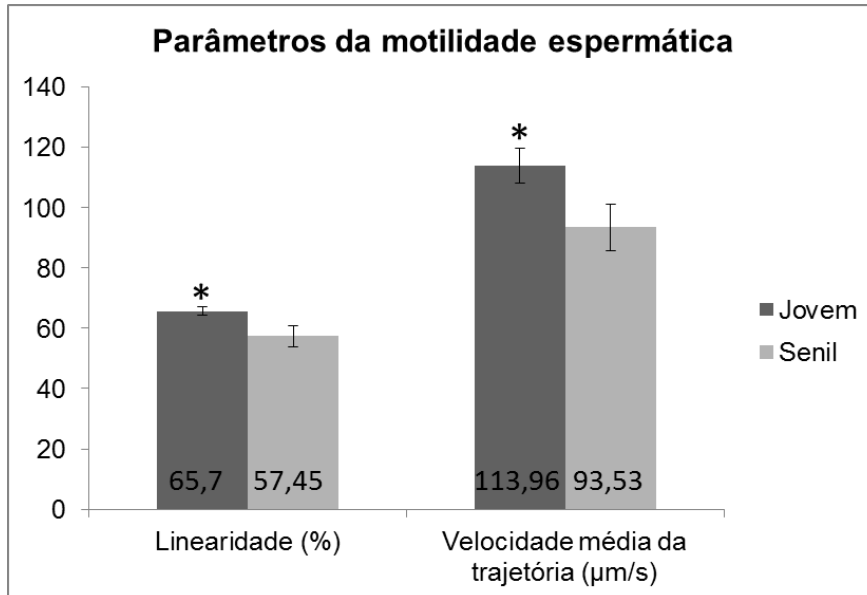


Figura 16 - Velocidade média da trajetória (VAP) e linearidade da motilidade nos grupos Jovem e Senil. * Indica diferença estatística entre grupos para $p < 0,05$.

Tabela 12 - Variáveis da análise computadorizada da motilidade (CASA) nos Grupos Jovem e Senil. São Paulo, 2017

Variável	Jovem	Senil	p
Velocidade linear (µm/s)	99,81±5,27	81,50±7,21	0,0507
Velocidade curvilínea (µm/s)	159,30±8,76	137,70±10,58	0,128
Amplitude de deslocamento lateral da cabeça (µm)	6,78±0,31	6,47±0,60	0,6101
Frequência de batimento flagelar cruzado (Hz)	21,97±1,68	23,07±1,73	0,6504
Retilinearidade (%)	86,95±0,78	81,09±4,04	0,1681
Motilidade (%)	63,80±5,86	51,95±6,63	0,1916
Motilidade progressiva (%)	36,40±4,99	30,41±5,43	0,4241
Motilidade em velocidade rápida (%)	41,80±5,66	34,32±6,12	0,378
Motilidade em velocidade média (%)	21,90±3,54	17,64±2,68	0,3374
Motilidade em baixa velocidade (%)	10,25±1,50	11,09±1,94	0,9157
Estáticos (%)	25,95±5,59	36,86±6,54	0,1989

Já nas avaliações realizadas com as sondas fluorescentes em aparelho de citometria de fluxo, não houve diferença estatística (Tabela 13).

Tabela 13 - Variáveis seminais nos Grupos Jovem e Senil. São Paulo, 2017

Variável	Jovem	Senil	P
Lesão de membrana plasmática e acrossomal (%)	51,45±6,36	43,19±5,25	0,3223
Membrana plasmática íntegra com lesão de membrana acrossomal (%)	3,35±0,95	5,96±2,12	0,3898
Médio potencial de membrana mitocondrial (%)	16,62±3,42	19,38±3,97	0,8177

Considerando as avaliações morfofuncionais do sêmen, os cães jovens apresentaram maior porcentagem de espermatozoides com alta atividade mitocondrial e menor porcentagem de espermatozoides com atividade mitocondrial média (Figura 16), assim como menor porcentagem de defeitos maiores, defeitos totais e gota citoplasmática proximal (Figura 17). As demais variáveis não apresentaram diferença estatística (Tabela 14).

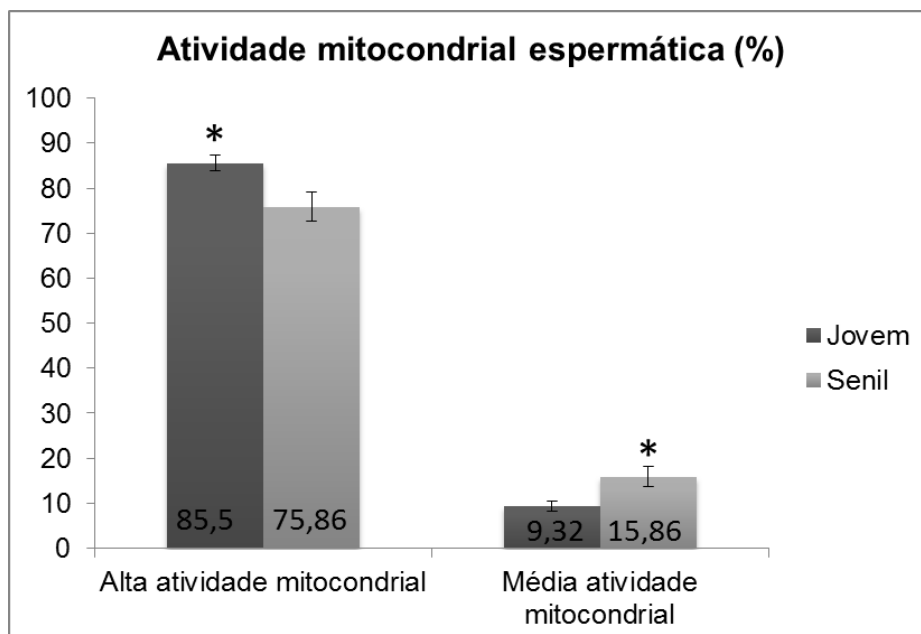


Figura 17 – Porcentagem de espermatozoides com alta e média atividade mitocondrial nos grupos Jovem e Senil. * Indica diferença estatística entre grupos para $p < 0,05$.

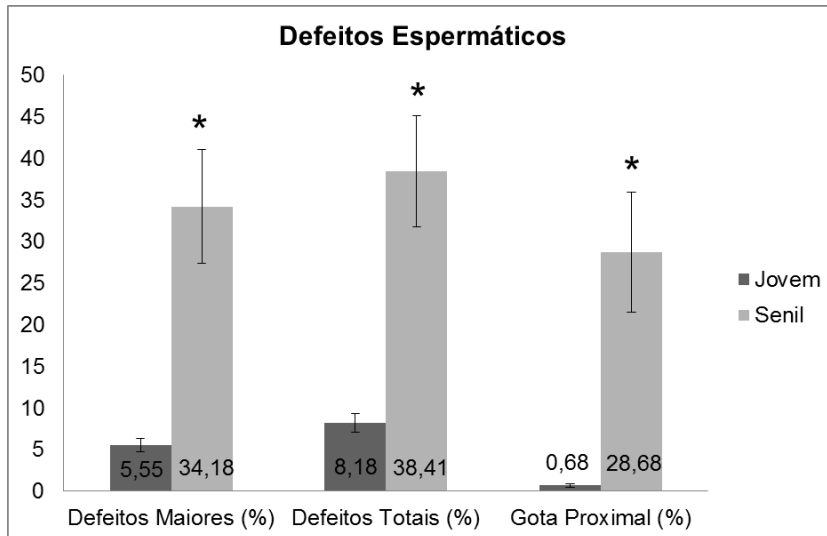


Figura 18 – Porcentagem de espermatozoides com defeitos espermáticos totais, defeitos espermáticos maiores e gota proximal nos grupos Jovem e Senil. * Indica diferença estatística entre grupos para $p < 0,05$.

Tabela 14 - Variáveis seminais nos Grupos Jovem e Senil. São Paulo, 2017

Variável	Jovem	Senil	p
Defeitos espermáticos menores (%)	2,64±0,52	4,23±1,36	0,2841
Gota distal (%)	0,86±0,25	2,32±1,24	0,2622
Integridade de membrana plasmática (%)	63,05±6,71	62,55±6,29	0,9569
Baixa atividade mitocondrial (%)	2,59±0,47	3,59±0,68	0,2309
Atividade mitocondrial ausente (%)	2,59±0,79	5,18±1,65	0,1668
Integridade de DNA (%)	88,37±1,58	86,90±2,35	0,6806
Concentração proteica no pellet de espermatozoide (ng/ml)	0,04±0,008	0,06±0,02	0,7657
Peroxidação lipídica (TBARS/milhão de espermatozoides)	448,46±65,41	373,40±39,58	0,4244

Na comparação entre os Grupos Fresco e Descongelado, as amostras descongeladas apresentaram menores valores para as seguintes variáveis obtidas pela avaliação computadorizada da motilidade: velocidade média da trajetória (VAP), velocidade linear progressiva (VSL), frequência de batimento flagelar cruzado (BCF), linearidade (%), motilidade espermática (%), motilidade progressiva (%), motilidade em velocidade rápida (%) (Tabela 10). Ainda, a respeito da avaliação computadorizada da motilidade, as variáveis de amplitude de deslocamento lateral

da cabeça (ALH) e espermatozoides estáticos (%) apresentaram maiores valores para amostras descongeladas. (Tabela 15).

Tabela 15 - Variáveis da análise computadorizada da motilidade (CASA) nos Grupos Fresco e Descongelado. São Paulo, 2017

Variável	Fresco	Descongelado	p
Velocidade média da trajetória ($\mu\text{m/s}$)	115,58 \pm 6,26	89,70 \pm 7,11	0,0091
Velocidade linear ($\mu\text{m/s}$)	102,88 \pm 5,74	76,30 \pm 6,38	0,0035
Velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s}$)	160,15 \pm 8,89	134,60 \pm 10,57	0,07
Amplitude de deslocamento lateral da cabeça (μm)	6,36 \pm 0,32	6,90 \pm 0,63	0,0074
Frequência de batimento flagelar cruzado (Hz)	27,92 \pm 0,67	16,63 \pm 1,55	<0,0001
Retilinearidade (%)	87,32 \pm 0,97	80,10 \pm 4,34	0,1193
Linearidade (%)	65,68 \pm 2,06	56,65 \pm 3,39	0,0083
Motilidade (%)	78,05 \pm 3,44	35,10 \pm 5,13	<0,0001
Motilidade progressiva (%)	49,00 \pm 3,98	15,95 \pm 3,51	<0,0001
Motilidade em velocidade rápida (%)	55,27 \pm 4,65	18,75 \pm 4,02	<0,0001
Motilidade em velocidade média (%)	22,73 \pm 3,52	16,30 \pm 2,35	0,1451
Motilidade em baixa velocidade (%)	9,50 \pm 1,33	12,00 \pm 2,13	0,4389
Estáticos (%)	12,50 \pm 2,96	52,75 \pm 5,60	<0,0001

Para as variáveis obtidas a partir da análise no aparelho de citometria de fluxo, as amostras frescas apresentaram maior integridade de membrana plasmática com lesão de membrana acrossomal (%) e porcentagem de espermatozoides com médio potencial de membrana mitocondrial (%), enquanto as amostras descongeladas apresentaram maior lesão de membrana plasmática e acrossomal (%) (Tabela 16).

Tabela 16 - Variáveis seminais nos Grupos Fresco e Descongelado. São Paulo, 2017

Variável	Fresco	Descongelado	p
Lesão de membrana plasmática e acrossomal (%)	30,11 \pm 5,96	59,85 \pm 3,36	<0,0001
Membrana plasmática íntegra com lesão de membrana acrossomal (%)	8,48 \pm 2,68	1,99 \pm 0,36	0,0024
Médio potencial de membrana mitocondrial (%)	28,57 \pm 4,15	9,36 \pm 1,94	0,0004

Para as variáveis obtidas nas análises morfofuncionais do sêmen, as amostras frescas apresentaram maior integridade de membrana plasmática (esfregaço corado em Eosina / Nigrosina- %), alta atividade mitocondrial (%) e peroxidação lipídica (TBARS/milhão de espermatozoides) e menor porcentagem de espermatozoides com baixa atividade mitocondrial (%) e concentração proteica no *pellet* de espermatozoides (ng/mL) (Tabela 17).

Tabela 17 - Variáveis seminais nos Grupos Fresco e Descongelado. São Paulo, 2017

Variável	Fresco	Descongelado	p
Defeitos espermáticos menores (%)	3,50±0,92	3,36±1,16	0,9268
Defeitos espermáticos maiores (%)	19,77±5,97	19,95±5,58	0,9823
Defeitos espermáticos totais (%)	23,27±5,94	23,32±5,69	0,6603
Gota proximal (%)	15,41±5,95	13,95±5,93	0,8634
Gota distal (%)	1,68±0,69	1,50±1,08	0,8882
Integridade de membrana plasmática (%)	85,55±3,41	40,05±4,87	<0,0001
Alta atividade mitocondrial (%)	86,73±2,17	74,64±2,63	0,0005
Média atividade mitocondrial (%)	7,23±0,70	17,95±2,05	<0,0001
Baixa atividade mitocondrial (%)	2,36±0,55	3,82±0,59	0,0784
Atividade mitocondrial nula (%)	3,68±1,65	4,09±0,87	0,8283
Integridade de DNA (%)	86,37±1,63	88,71±2,31	0,307
Concentração proteica no <i>pellet</i> de espermatozoide (ng/ml)	0,02±0,003	0,09±0,02	<0,0001
Peroxidação lipídica (TBARS/milhão de espermatozoides)	478,34±57,67	343,52±47,13	0,0055

6.3. Análise de correlação

6.3.1. Grupo Jovem

Nas análises de correlação do grupo jovem, a oxidação de proteínas no plasma seminal correlacionou-se positivamente com a porcentagem de espermatozoides com lesão de membrana plasmática e acrossomal e

negativamente com a linearidade da motilidade e amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) (Figura 18). Já o estrógeno sérico correlacionou-se positivamente com a oxidação de proteína no *pellet* de espermatozoides e negativamente com a velocidade média da trajetória (VAP) (Figura 19). Os demais valores de correlações do grupo jovem encontram-se no Anexo 2.

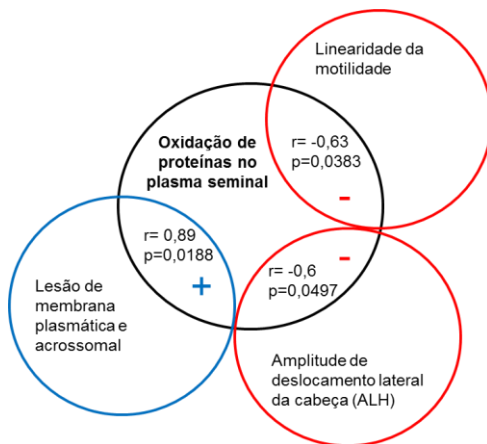


Figura 19 - Análise de correlação da variável oxidação de proteínas no plasma seminal com as variáveis de lesão de membrana plasmática e acrossomal, amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) e linearidade de motilidade.

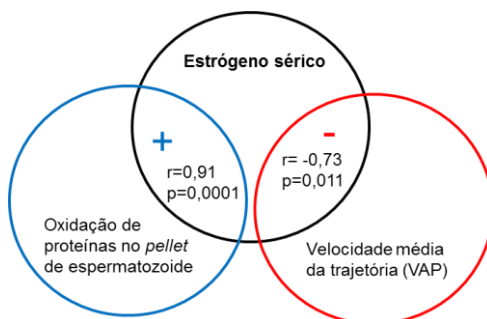


Figura 20 - Análise de correlação do estrógeno sérico com as variáveis de oxidação de proteínas no pellet de espermatozoides e velocidade média da trajetória (VAP).

6.3.2. Grupo Senil

Nas análises de correlação do grupo senil, a oxidação de proteínas no plasma seminal correlacionou-se positivamente com a concentração dos produtos avançados de glicação no plasma seminal e negativamente com a porcentagem de espermatozoides com integridade de membrana plasmática e acrossomal (Figura

20). Já o estrógeno sérico correlacionou-se positivamente com a ausência de atividade mitocondrial (Figura 21) e a testosterona sérica correlacionou-se negativamente com os defeitos espermáticos menores e com os produtos avançados de glicação no plasma seminal (Figura 22). Os demais valores de correlação no Grupo Jovem encontram-se no Anexo 3.

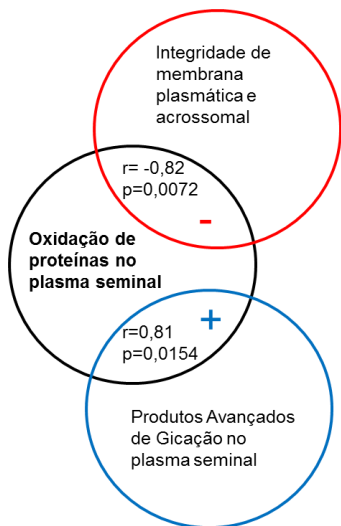


Figura 21 - Análise de correlação da oxidação de proteínas no plasma seminal com os produtos avançados de glicação no plasma seminal e integridade de membrana plasmática e acrossomal.

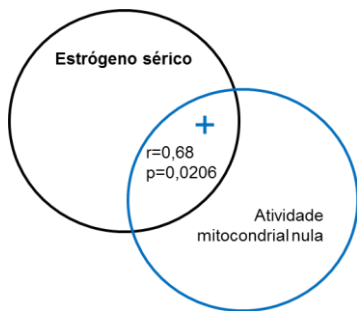


Figura 22 - Análise de correlação do estrógeno sérico com a atividade mitocondrial nula.

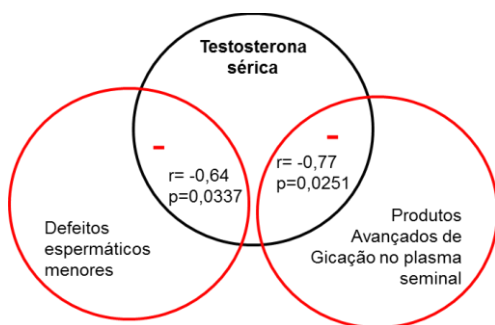


Figura 23 - Análise de correlação da testosterona sérica com as variáveis de defeitos espermáticos menores e produtos avançados de glicação no plasma seminal.

Discussão

7. DISCUSSÃO

Em relação à espécie canina, principalmente no que diz respeito à senescência reprodutiva, as doenças de próstata (especialmente a Hiperplasia Prostática Benigna - HPB), mostram-se bastante importantes. De acordo com Berry et al. (1986), a incidência de HPB em cães é de 16%, 50% e 95%, respectivamente, aos 2, 5 e 9 anos de idade. Nesta afecção, há um desequilíbrio hormonal, representado por redução em 40% da concentração de testosterona e 60% de estradiol (COCHRAN et al., 1981). De acordo com nossos resultados, não houve diferença nas dosagens séricas de estrógeno e testosterona entre os grupos Jovem e Senil, o que demonstra não haver deficiência na síntese hormonal, em resposta ao GnRH, nos cães em idade avançada, descartando, portanto, a influência do envelhecimento sobre a relação dos níveis circulantes dos hormônios esteroidais e até, possivelmente, sua influência nas afecções relacionadas à senescência. Por outro lado, para o grupo Jovem, a concentração de estrógeno sérico correlacionou-se positivamente com a oxidação proteica nos espermatozoides e negativamente com a velocidade média da trajetória (VAP) analisada pelo CASA. Segundo Hess et al. (2011), a enzima aromatase citocromo P450, responsável pela conversão de andrógenos em estrógeno, está presente na gota citoplasmática e peça intermediária espermática. Portanto, acreditamos que o conteúdo da gota citoplasmática aumente o nível estrogênico no sêmen, e ambos fatores levam à alterações seminais, promovendo estresse oxidativo (oxidação proteica). Ainda segundo os referidos autores, as células epiteliais do trato reprodutivo masculino apresentam concentrações equivalentes de receptores estrogênicos e androgênicos, sugerindo haver adequado balanço hormonal para a fisiologia reprodutiva nos machos. Apesar do papel fundamental do estrógeno na função reprodutiva masculina, o desbalanço entre os níveis hormonais parece causar disfunções espermáticas. No presente experimento, observamos correlação positiva entre as concentrações de estrógeno sérico e a ausência de atividade mitocondrial espermática em cães senis, sugerindo que, durante o envelhecimento, o desbalanço hormonal (aumento da concentração estrogênica) no tecido testicular é responsável por efeitos deletérios aos espermatozoides. Ademais, em relação à testosterona no grupo Senil, houve correlação negativa com a porcentagem de defeitos

espermáticos menores e a concentração dos produtos avançados de glicação, evidenciando a importância de adequados níveis circulantes de testosterona para a manutenção da espermatogênese e maturação espermática, especialmente em indivíduos senescentes.

No presente experimento, o grupo Jovem demonstrou maior escore de libido em comparação ao Grupo Senil. A testosterona está diretamente ligada à libido e Snyder et al. (2016) indicam que o aumento dos níveis de testosterona no homem está associado a aumentos significativos de desejo sexual e função erétil. Portanto, embora demonstramos que não há deficiência gonadal na produção ou conversão de testosterona e estrógeno após estímulo exógeno de GnRH, não é possível descartar desbalanços na produção hormonal fisiológica ao longo do ciclo circadiano. Ainda, mesmo com níveis hormonais inalterados, pode-se inferir possível disfunção dos receptores hormonais em órgãos alvo, diminuindo a resposta à ação hormonal mesmo sob concentrações séricas adequadas. Neste sentido, futuros estudos com enfoque na quantificação de receptores teciduais para os principais hormônios esteroidais são necessários para elucidar tal constatação.

Com relação à análise exclusiva no sêmen fresco, as amostras de cães senis apresentaram maior porcentagem de espermatozoides com integridade das membranas plasmática e acrossomal, enquanto as amostras de cães jovens apresentaram maior porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática lesionada e membrana acrossomal íntegra. Neste sentido, podemos inferir que os espermatozoides provenientes de cães jovens possuem maior permeabilidade de membrana plasmática em comparação aos cães senis, não necessariamente significando lesão de membrana plasmática no grupo Jovem. Segundo Cooper et al. (2004), espermatozoides com gota citoplasmática possuem um mecanismo de proteção celular para suportar meios hiposmóticos, dificultando o transporte de substâncias para o meio intracelular. Desta forma, é possível inferir que as sondas fluorescentes, utilizadas no presente experimento para análise da integridade de membranas espermáticas, apresentem reduzido grau de permeabilidade no espermatozoide contendo gota citoplasmática. De fato, o grupo Senil apresentou maior porcentagem de defeitos espermáticos maiores e totais, representados por maior índice de espermatozoides com gota citoplasmática proximal. Portanto, os espermatozoides oriundos de cães senis apresentam reduzido influxo de substratos

para o interior da célula espermática, principalmente decorrente da presença da gota citoplasmática.

Estudos recentes no homem demonstram haver redução da qualidade seminal (vitalidade e morfologia espermáticas) com o avançar da idade (SHARMA et al., 2015). De forma geral, os resultados do presente experimento permitem observar tal constatação também na espécie canina. De acordo com Rijsselaere et al. (2007), os cães, de fato, produzem ejaculados com menor porcentagem de espermatozoides normais durante a progressão da senilidade, corroborando nosso estudo, o qual detectou aumento de defeitos espermáticos (principalmente os maiores, dentre eles, a gota citoplasmática proximal). Supõe-se que tal resultado esteja relacionado à falha na espermatogênese ou maturação espermática em cães idosos. De acordo com Carreira et al. (2012), o maior número de espermatozoides com gotas citoplasmáticas proximais em touros é considerado um sinal de anormalidade na espermatogênese ou maturação epididimária. Da mesma forma, Peña et al. (2007) elucidam que espermatozoides caninos com gotas citoplasmáticas proximais sofrem falha na capacitação espermática.

No presente experimento, o Grupo Senil apresentou maior porcentagem de espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial, enquanto o Grupo Jovem apresentou maior porcentagem de espermatozoides com baixo potencial de membrana mitocondrial. Por outro lado, a porcentagem de espermatozoides com alta atividade mitocondrial apresentou-se maior no Grupo Jovem em comparação ao Grupo Senil. Por mais que a atividade mitocondrial e o potencial de membrana mitocondrial sejam indicadores da função mitocondrial, cada parâmetro representa um mecanismo de ação da mitocôndria na célula espermática. O potencial de membrana mitocondrial está relacionado à capacidade das mitocôndrias em bombear prótons da matriz mitocondrial para o espaço inter-membrana, utilizando a energia livre gerada pelo transporte de elétrons, produzindo um gradiente eletroquímico (CHEN, 1988; SARASTE, 1999). Portanto, o potencial mitocondrial funciona como indicador para o estado energético das mitocôndrias e da célula, caracterizando o metabolismo celular (MARCHETTI et al., 2004), porém, não é sinônimo de atividade mitocondrial. Ou seja, a mitocôndria pode manter seus processos de oxirredução através do transporte de elétrons mesmo com baixo potencial de membrana (CHEN, 1988; TERADA, 1990). Portanto, as avaliações dos dois parâmetros podem ser utilizadas de forma complementar. Por exemplo,

Nascimento e colaboradores (2008) demonstraram que a motilidade de espermatozoides humanos não depende do potencial de membrana mitocondrial. De forma semelhante, em nosso experimento, o sêmen de cães jovens apresentou maior velocidade média da trajetória (VAP) e maior linearidade da motilidade, a despeito do menor potencial de membrana mitocondrial, em comparação aos cães senis. Desta forma, podemos afirmar que a senilidade interfere com a atividade mitocondrial dos espermatozoides e, como consequência, com o padrão de motilidade espermática, mesmo havendo maior metabolismo celular (ou potencial de membrana mitocondrial).

A gota citoplasmática proximal é considerada um remanescente do processo de fagocitose do citoplasma de células germinativas pelas células de Sertoli durante a espermatogênese normal. Na fase de espermição, a gota citoplasmática permanece aderida à peça intermediária da espermátide quando esta é modificada em espermatozoide (COOPER, 2005). A gota citoplasmática é constituída por diversos substratos, tais como substâncias envolvidas na produção energética, incluindo enzimas metabólicas responsáveis pela catalisação da glicólise anaeróbica (YUAN et al., 2013). De acordo com Angrimani et al. (2015), a mitocôndria é a principal fonte de energia para a motilidade e homeostase espermática, por meio da fosforilação oxidativa. Portanto, a presença da gota proximal na região da peça intermediária pode determinar deficiência na fosforilação oxidativa pela mitocôndria e mesmo na própria ação dos substratos para glicólise anaeróbica presentes na gota. Em nosso experimento, observamos maior porcentagem de espermatozoides com gota citoplasmática nos indivíduos senis, resultado que acreditamos ser responsável pela baixa atividade mitocondrial e, compensatoriamente, pelo maior potencial de membrana mitocondrial no Grupo Senil em comparação ao Grupo Jovem.

No grupo de cães senis, o potencial de membrana mitocondrial e a atividade mitocondrial são mais elevados no sêmen fresco em comparação ao sêmen criopreservado. Ademais, o Grupo Descongelado apresentou menor motilidade, motilidade progressiva, linearidade da motilidade, porcentagem de espermatozoides rápidos, velocidade média da trajetória (VAP), velocidade linear progressiva (VSL) e batimento flagelar cruzado (BCF), assim como maior amplitude de deslocamento lateral da cabeça e porcentagem de espermatozoides estáticos. Lucio et al. (2016) relatam que o estresse oxidativo durante o processo de criopreservação é

responsável por danos ao espermatozoide canino, causando perda da atividade mitocondrial, alterações na motilidade espermática e danos à membrana plasmática e acrossomal. Embora tenhamos identificado as mesmas alterações morfo-funcionais do sêmen criopreservado nos cães senis, surpreendentemente no presente estudo, os resultados de peroxidação lipídica mostraram-se mais altos no Grupo Fresco. Acreditamos, portanto, que os espermatozoides de cães senis tenham sofrido extensa injúria após a criopreservação, inviabilizando as etapas do protocolo de determinação da peroxidação lipídica (TBARS) utilizado neste experimento (p.e., tempo total de incubação).

De acordo com Peña et al. (1999), a citometria de fluxo deve ser interpretada com cautela quando se utiliza amostras celulares não submetidas à prévia lavagem para remoção de debris e partículas. Para o caso de espermatozoides pós descongelação, a lavagem das amostras torna-se inviável, havendo possibilidade de ruptura e morte celular por maior fragilidade da célula espermática. Tal dificuldade técnica pode incorrer em resultados incongruentes como, por exemplo, a menor porcentagem de espermatozoides com lesão de membrana plasmática (e membrana acrossomal íntegra) nas amostras descongeladas de cães jovens, em comparação ao sêmen fresco. Acreditamos, portanto, que no sêmen descongelado o meio diluente possa ter interferido na contagem de espermatozoides lesionados. Ainda, o Grupo Descongelado apresentou maior concentração de proteína no espermatozoide, resultado que pode ser atribuído à adesão de componentes do meio diluente à membrana plasmática da célula espermática. Desta maneira, é possível que proteínas do diluidor aderidas à membrana plasmática tenham efeito protetor ao espermatozoide durante a criopreservação. Em contrapartida, houve maior integridade de membranas acrossomal e plasmática no sêmen fresco de cães senis, em comparação ao sêmen descongelado, demonstrando que o efeito protetor do meio diluente não foi capaz de evitar danos às membranas espermáticas após a criopreservação quando o doador de sêmen é idoso.

Com relação à integridade de membrana acrossomal avaliada por esfregaço corado em Fast Green/Rosa Bengala, o sêmen fresco dos cães jovens e senis apresentou maior integridade em comparação ao sêmen criopreservado. Ainda, o sêmen descongelado de cães jovens apresentou maior porcentagem de espermatozoides com membrana acrossomal íntegra em comparação aos cães senis, demonstrando que o sêmen criopreservado de animais idosos é mais

susceptível ao dano acrossomal. De acordo com Lucio et al. (2016), é importante manter a integridade acrossomal do espermatozoide para que não haja perda de enzimas acrossomais fundamentais no potencial de fertilização espermático. O processo de criopreservação pode causar mudanças na membrana acrossomal, podendo funcionar como gatilho para a capacitação espermática precoce (ROTA et al., 1999; BURGESS et al., 2012). Portanto, o efeito da senilidade no espermatozoide é representado por alterações na membrana acrossomal, especialmente do sêmen criopreservado, reduzindo significativamente seu potencial fecundante.

Embora nossos resultados não permitam assegurar diferenças no estresse oxidativo, oxidação de proteínas e produtos avançados de glicação à comparação dos grupos Jovem e Senil, verificamos efeitos deletérios da oxidação de proteínas no plasma seminal à análise de correlação. No sêmen de cães jovens, a oxidação de proteínas do plasma seminal correlacionou negativamente com os parâmetros da motilidade espermática e positivamente com a lesão de membranas plasmática e acrossomal. Portanto, conforme relatado por Vernet et al. (2004); Nichi et al. (2007) e Agarwal et al. (2014), a oxidação proteica pode atuar negativamente em diferentes estruturas espermáticas, como a membrana plasmática e acrossomal, mitocôndria e DNA espermático. No sêmen de cães senis, a oxidação de proteínas do plasma seminal apresentou correlação positiva com os produtos avançados de glicação e negativa com a integridade de membranas plasmática e acrossomal, corroborando a ideia de potencialização dos efeitos oxidativos dos AGEs (KOYAMA; NISHIZAWA, 2010; HELLWIG; HENLE, 2014) sobre a integridade da célula espermática.

Conclusão

8. CONCLUSÃO

- ✓ O sêmen de cães senis apresenta reduzida qualidade, representada por maior incidência de defeitos espermáticos, em sua maioria gotas citoplasmáticas proximais, as quais alteram a função mitocondrial espermática, culminando em modificações nos parâmetros de motilidade;
- ✓ O sêmen de cães senis não apresenta distinções aos cães jovens quanto ao estresse oxidativo, oxidação proteica e produtos avançados de glicação, portanto tais avaliações não se mostram acuradas para a avaliação do impacto da senescência reprodutiva;
- ✓ O sêmen de cães senis apresenta reduzidas características de congelabilidade em comparação aos cães jovens, sendo possível indicar o emprego da criopreservação seminal idealmente para cães jovens em maturidade reprodutiva.

Referências

9. REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; VIRK, G.; ONG, C.; DU PLESSIS, S. S. Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. **The World Journal of Men's Health**, v. 32, n. 1, p. 1-17, 2014.

AMARAL, S.; AMARAL, A.; RAMALHO-SANTOS, J. Aging and Male Reproductive Function: a Mitochondrial Perspective. **Frontiers in Bioscience**, v. 5, p. 181-197, 2013.

ANGRIMANI, D. R. R.; LOSANO, J. D. A.; RUI, B. R.; BICUDO, L. C.; ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C. Ferramentas para Avaliação da Funcionalidade da Mitocôndria Espermática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, n. 2, p. 277-283, 2015.

ARSOV, S.; GRAAFF, R.; OEVEREN, W.; STEGMAYR, B.; SIKOLE, A.; RAKHORST, G.; SMIT, A. J. Advanced Glycation End-Products and Skin Autofluorescence in End-Stage Renal Disease: a Review. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 52, n. 1, p. 11-20, 2014.

BARBAS, J. P.; MASCARENHAS, R. D. Cryopreservation of Domestic Animal Sperm Cells. **Cell and Tissue Banking**, v. 10, n. 1, p. 49-62, 2009.

BARTH, A. D., OKO, R. J. Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa. 1st Ed. Ames, IA: Iowa State University Press; 1989.

BELLOWS, J.; COLITZ, C. M. H.; DARISTOTLE, L.; INGRAM, D. K.; LEPINE, A.; MARKS, S. L.; SANDERSON, S. L.; TOMLINSON, J.; ZHANG, J. Common Physical and Functional Changes Associated with Aging in Dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 246, n. 1, p. 67-75, 2015.

BEM, A. KUNDE, J. A Importância da Determinação da Hemoglobina Glicada no Monitoramento das Complicações Crônicas do Diabetes Mellitus. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 3, p. 185-191, 2006.

BENKHALIFA, M.; FERREIRA, Y. J.; CHAHINE, H.; LOUANJLI, N.; MIRON, P.; MERVIEL, P.; COPIN, H. Mitochondria: Participation to Infertility as Source of Energy

and Cause of Senescence. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 55, p. 60-64, 2014.

BERRY, S. J.; STRANDBERG, J. D.; SAUNDERS, W. J.; COFFEY, D. S. Development of Canine Benign Prostatic Hyperplasia with Age. **Prostate**, v. 9, n. 4, p. 363-373, 1986.

BRITO, M. M.; LUCIO, C. F.; ANGRIMANI, D. S. R.; LOSANO, J. D. A.; DALMAZZO, A.; NICHI, M.; VANNUCCHI, C. I. Comparison of Cryopreservation Protocols (Single and Two-steps) and Thawing (Fast and Slow) for Canine Sperm. **Animal Biotechnology**, v. 28, n. 1, p. 67-73, 2017.

BRONWLEE, M. The Pathobiology of Diabetic Complications. A Unifying Mechanism. **American Diabetes Association**, v. 56, n. 6, p. 1615-1625, 2005.

BURGESS, C. M.; CLUTTERBUCK, A. L.; ENGLAND, G. C. The Effect of Cryopreservation on the Capacitation Status and Epithelial Cell Attachment Capability of Dog Spermatozoa. **The Veterinary Journal**, v. 192, p. 398-402, 2012.

CARREIRA, J. T.; MINGOTI, G. Z.; RODRIGUES, L. H.; SILVA, C.; PERRI, S. H. V.; KOIVISTO, M. B. Impact of Proximal Cytoplasmic Droplets on Quality Traits and In-Vitro Embryo Production Efficiency of Cryopreserved Bull Spermatozoa. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 54 n. 1, 2012.

CELEGHINI, E. C.; DE ARRUDA, R. P.; DE ANDRADE, A. F.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Practical Techniques for Bovine Sperm Simultaneous Fluorimetric Assessment of Plasma, Acrosomal and Mitochondrial Membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 5, p. 479-488, 2007.

CHEN, L. B. Mitochondrial Membrane Potential in Living Cells. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 4, n. 1, p. 155-181, 1988.

COCHRAN, R. C.; EWING, L. L.; NISWENDER, G. D. Serum Levels of Follicle Stimulating Hormone, Luteinizing Hormone, Prolactin, Testosterone, 5 Alpha-Dihydrotestosterone, 5 Alpha-Androstane-3 Alpha, 17 Beta-Diol, 5 Alpha-Androstane-3 Beta, 17 Beta-Diol, and 17 Beta-Estradiol from Male Beagles with Spontaneous or Induced Benign Prostatic Hyperplasia. **Investigative Urology Journal**, v. 19, n. 3, p. 142-147, 1981.

COOPER, T. G.; YEUNG, C. H.; WAGENFELD, A.; NIESCHLAG, E.; POUTANEN, M.; HUHTANIEMI, I.; SIPILÄ, P. Mouse Models of Infertility Due to Swollen Spermatozoa. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 216, p. 55-63, 2004.

COOPER, T. G. Cytoplasmic Droplets: the Good, the Bad or Just Confusing? **Human Reproduction**, v. 20, p. 9-11, 2005.

DYER, D. G.; BLACKLEDGE, J. A.; THORPE, S. R.; BAYNES, J. W. Formation of pentosidine during nonenzymatic browning of proteins by glucose. Identification of Glucose and Other Carbohydrates as Possible Precursors of Pentosidine In Vivo. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, p. 11654-11660, 1991.

EDEAS, M.; WEISSING, V. Targeting Mitochondria: Strategies, Innovations, and Challenges: the Future of Medicine Will Come Through Mitochondria. **Mitochondrion**, v. 13, n. 5, p. 389-390, 2013.

FAGAN, J. M.; SLECZKA, B. G.; SOHAR, I. Quantitation of Oxidative Damage to Tissue Proteins. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 31, n. 7, p. 751-757, 1999.

FELDMAN, H. A.; LONGCOPE, C.; DERBY, C. A.; JOHANNES, C. B.; ARAUJO, A. B.; COVIELLO, A. D.; BREMNER, W. J.; MCKINLAY, J. B. Age Trends in the Level of Serum Testosterone and Other Hormones in Middle-Aged Men: Longitudinal Results From the Massachusetts Male Aging Study. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 87, n. 2, p. 589-598, 2002.

FENNEMA, O. R.; PARKIN, K. L.; DAMODARAN, S. **Química de Alimentos de Fennema**, Editora Artmed, ed. 4, 2008.

FERRINI, R. L.; BARRETT-CONNOR, E. Sex Hormones and Age: a Cross-Sectional Study of Testosterone and Estradiol and Their Bioavailable Fractions in Community-Dwelling Men. **American Journal of Epidemiology**, v. 147, n. 8, p. 750-754, 1998.

FLORES, R. B.; ANGRIMANI, D. S. R.; RUI, B. R.; BRITO, M. M.; ABREU, R. A.; VANNUCCHI, C. I. The Influence of Benign Prostatic Hyperplasia on Sperm Morphological Features and Sperm DNA Integrity in Dogs. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, suppl. 3, p. 1-6, 2006.

FRESHMAN, J. L. Semen Collection and Evaluation. **Clinical Techniques in Small Animal Practice**, v. 17, n. 3, p. 104-107, 2002.

GARNER, D. L.; THOMAS, C. A.; JOERG, H. W.; DEJARNETTE, J. M.; MARSHALL, C. E. Fluorometric Assessments of Mitochondrial Function and Viability in Cryopreserved Bovine Spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 57, n. 6, p. 1401-1406, 1997.

GILMORE, K. M.; GREER, K. A. Why is the Dog an Ideal Model for Aging Research? **Experimental Gerontology**, v. 71, p. 14-20, 2015.

GOLDBERG, T. CAI, W. PEPPA, M.; DARDAINE, V.; BALIGA, B. S.; URIBARRI, J.; VLASSARA, H. Advanced Glycoxidation End Products in Commonly Consumed Foods. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 104, n. 8, p. 1287-1291, 2004.

GOMEZSANCHEZ, A.; HERMOSIN, I.; MAYA, I. Influence of Malondialdehyde on the Maillard Degradation of Amadori Compounds. **Carbohydrate Research**, v. 229, n. 2, p. 307-322, 1992.

GUNES, S.; HEKIM, G. N. T.; ARSLAN, M. A.; ASCI, R. Effects of Aging on the Male Reproductive System. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 33, n. 4, p. 441-454, 2016.

HAMMAR, M. Impaired In Vitro Testicular Endocrine Function in Elderly Men. **Andrologia**, v. 17, n. 5, p. 444-449, 1985.

HELLWIG, M.; HENLE, T. Baking, Ageing, Diabetes: a Short History of the Maillard Reaction. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 53, n. 39, p. 10316-10329, 2014.

HESS, R. A.; FERNANDES, S. A. F.; GOMES, G. R. O.; OLIVEIRA, C. A.; LAZARI, M. F. M.; PORTO, C. S. Estrogen and Its Receptors in Efferent Ductules and Epididymis. **Journal of Andrology**, v. 32, n. 6, p. 600-613, 2011.

HIPKISS, A. R.; WORTHINGTON, V. C.; HIMSWORTH, D. T.; HERWIG, W. Protective Effects of Carnosine Against Protein Modification Mediated by

Malondialdehyde and Hypochlorite. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1380, n. 1, p. 46-54, 1998.

HRUDKA, F. Cytochemical and Ultracytochemical Demonstration of Cytochrome C Oxidase in Spermatozoa and Dynamics of Its Changes Accompanying Ageing or Induced by Stress. **International Journal of Andrology**, v. 10, n. 6, p. 809-828, 1987.

IRVINE, D. S.; TWIGG, J. P.; GORDON, E. L.; FULTON, N.; MILNE, P. A.; AITKEN, R. J. DNA Integrity in Human Spermatozoa: Relationships with Semen Quality. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 1, p. 33-44, 2000.

KATIB, A. A.; AL-HAWSAWI, K.; MOTAIR, W.; BAWA, A. M. Secondary Infertility and the Aging Male, Overview. **Central European Journal of Urology**, v.67, n. 2, p.184-188, 2014.

KATO, S.; ITOH, K.; OCHIAI, M.; IWAI, A.; PARK, Y.; HATA, S.; TAKEUCHI, K.; ITO, M.; IMAKI, J.; MIURA, S.; YAKABI, K.; KOBAYASHI, M. Increased Pentosidine, an Advanced Glycation End-Product, in Urine and Tissue Reflects Disease Activity in Inflammatory Bowel Disease. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 23, Suppl. 2; p. 140-145, 2008.

KAWAKAMI, E.; AMEMIYA, E.; NAMIKAWA, K.; KASHIWAGI, C.; HORI, T.; TSUTSUI, T. High Plasma Estradiol-17beta Levels in Dogs with Benign Prostatic Hyperplasia and Azoospermia. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, n. 4, p. 407-412, 2001.

KIDD, S.; ESKENAZI, B.; WYROBEK, A. Effects of Male Age on Semen Quality and Fertility: a Review of the Literature. **Fertility and Sterility**, v. 75, n. 2, p. 237-248, 2001.

KOYAMA H.; NISHIZAWA, Y. Cardiovascular Complications in Renal Failure: Implications of Advanced Glycation End-Products and Their Receptors, RAGE. Em: MIYATA, T.; ECKARDT, K. U.; NANGAKU, M. Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice "Renal Disorders". Nova York: The Human Press/Springer Science, 2010.

LABAT-ROBERT, J.; ROBERT, L. Longevity and Aging. Role of Free Radicals and Xanthine Oxidase. A review. **Pathologie Biologie**, v. 62, n. 2, p. 61-66, 2014.

LEVINE, R. L.; GARLAND, D.; OLIVER, C. N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A. G.; AHN, B. W.; SHALTIEL, S.; STADTMAN, E. R. Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. **Methods Enzymology**, v. 186, p. 464-478, 1990.

LIU, F. J.; LIU, X.; HAN, J. L.; WANG, Y. W.; JIN, S. H.; LIU, X. X.; LIU, J.; WANG, W. T.; WANG, W. J. Aged Men Share the Sperm Protein PATE1 Defect with Young Asthenozoospermia Patients. **Human Reproduction**, v. 30, n. 4, p. 861-869, 2015.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein Measurement with the Folin - Phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265 - 276, 1951.

LUCIO, C. F.; SILVA, L. C. G.; REGAZZI, F. M.; ANGRIMANI, D. S. R.; NICHI, M.; ASSUMPÇÃO, M. E. O.; VANNUCCHI, C. I. Effect of Reduced Glutathione (GSH) in Canine Sperm Cryopreservation: In Vitro and In Vivo Evaluation. **Cryobiology**, v. 72, n. 2, p. 135-140, 2016.

LUCIO, C. F.; REGAZZI, F. M.; SILVA, L. C.; ANGRIMANI, D. S.; NICHI, M.; VANNUCCHI, C. I. Oxidative Stress at Different Stages of Two-Steps Semen Cryopreservation Procedures in Dogs. **Theriogenology**, v. 85, n. 9, p. 1568-1575, 2016.

MARCHETTI, C.; JOUY, N.; LEROY-MARTIN, B.; DEFOSSEZ, A.; FORMSTECHE, P.; MARCHETTI, P. Comparison of four fluorochromes for the detection of the inner mitochondrial membrane potential in human spermatozoa and their correlation with sperm motility. **Human Reproduction**, v. 19, n. 10, p. 2267-2276, 2004.

MONNIER, V.; Intervention Against the Maillard Reaction In Vivo. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 419, n. 1, p. 1-15, 2003.

MOOKERJEE, S.; DIVAKARUNI, A.; JASTROCH, M.; BRAND, M. Mitochondrial Uncoupling and Lifespan. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 131, n. 7-8, p. 463-472, 2010.

MORLEY, J. E.; KAISER, F. E.; PERRY H. M. 3^o; PATRICK, P.; MORLEY, P. M.; STAUBER, P. M.; VELLAS, B.; BAUMGARTNER, R. N.; GARRY, P. J. Longitudinal Changes in Testosterone, Luteinizing Hormone, and Follicle-Stimulating Hormone in Healthy Older Men. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 46, n. 4, p. 410-413, 1997.

MOTA, M. P.; FIGUEIREDO, P. A.; DUARTE, J. A. Teorias Biológicas do Envelhecimento. **Revista Portuguesa de Ciência do Desporto**, v. 4, n. 1, p. 81-110, 2004.

NASCIMENTO, J. M.; SHI, L. Z.; CHANDSAWANGBHUWANA, C.; TAM, J.; DURRANT, B.; BOTVINICK, E. L.; BERNIS, M. W. Use of Laser Tweezers to Analyze Sperm Motility and Mitochondrial Membrane Potential. **Journal of Biomedical Optics**, v. 13, n. 1, 014002, 2008.

NICHI, M.; GOOVAERTS, I. G. F.; CORTADA, C. N. M.; BARNABE, V. H.; DE CLERCQ, J. B. P.; BOLS, P. E. J. Roles of Lipid Peroxidation and Cytoplasmic Droplets on In Vitro Fertilization Capacity of Sperm Collected from Bovine Epididymides Stored at 4 and 34 degrees C. **Theriogenology**, v. 67, n. 2, p. 334-340, 2007.

ODETTI, P.; GARIBALDI, S.; GURRERI, G.; ARAGNO, I.; DAPINO, D.; PRONZATO, M. A.; MARINARI, U. M. Protein oxidation in hemodialysis and kidney transplantation. **Metabolism**, v. 45, n. 11, p. 1319-1322, 1996.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

PACE, G.; DI MASSIMO, C.; DE AMICIS, D.; CORBACELLI, C.; DI RENZO, L.; VICENTINI, C.; MIANO, L.; TOZZI CIANCARELLI, M. G. Oxidative Stress in Benign Prostatic Hyperplasia and Prostate Cancer. **Urologia Internationalis**, v. 85, n. 3, p. 328-333, 2010.

PEÑA, A.; JOHANNISSON, A.; LINDE-FORSBERG, C. Post-Thaw Evaluation of Dog Spermatozoa Using New Triple Fluorescent Staining and Flow Cytometry. **Theriogenology**, v. 53, p. 965-980, 1999.

PEÑA, A. I.; BARRIO, M.; BECERRA, J. J.; QUINTELA, L. A.; HERRADON, P. G. Infertility in a Dog Due to Proximal Cytoplasmic Droplets in the Ejaculate: Investigation of the Significance for Sperm Functionality In Vitro. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 5, p. 471-478, 2007.

PETERS, M. A.; DE ROOIJ, D. G.; TEERDS, K. J.; VAN DER GAAG, I.; VAN SLUIJS, F. J. Spermatogenesis and Testicular Tumours in Ageing Dogs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 57, p. 419-421, 2001.

PETERSON, R. N.; SILVERSTEIN, K.; FREUND, M. A Rapid Fluorometric Method for the Determination of DNA in Human Semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 41, n. 2, p. 485-488, 1974.

PICCOLI, C.; SCRIMA, R.; D'APRILE, A.; RIPOLI, M.; LECCE, L.; BOFFOLI, D.; CAPITANIO, N. Mitochondrial Dysfunction in Hepatitis C Virus Infection. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1757, n. 9, p. 1429-1437, 2006.

PIRKE, K. M.; SINTERMANN, R.; VOGT, H. J. Testosterone and Testosterone Precursors in the Spermatic Vein and in the Testicular Tissue of Old Men. Reduced Oxygen Supply May Explain the Relative Increase of Testicular Progesterone and 17 Alpha-Hydroxyprogesterone Content and Croduction in Old Age. **Gerontology**, v. 26, n. 4, p. 221-230, 1980.

PLASTIRA, K.; ANGELOPOULOU, R.; MANTAS, D.; MSAOUEL, P.; LYRAKOU, S.; PLASTIRAS, A.; BOLARIS, S.; BAKA, S.; PAPANISTEIDIS, N. The effect of Age on the Incidence of Aneuploidy Rates in Spermatozoa of Oligoasthenozoospermic Patients and Its Relationship with ICSI Outcome. **International Journal of Andrology**, v. 30, n. 2, p. 65-72, 2007.

POLISCA, A.; ORLANDI, R.; TROISI, A.; BRECCHIA, G.; ZERANI, M.; BOITI, C.; ZELLI, R. Clinical Efficacy of the GnRH Agonist (Deslorelin) in Dogs Affected by Benign Prostatic Hyperplasia and Evaluation of Prostatic Blood Flow by Doppler Ultrasound. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 4, p. 673-680, 2013.

POPE, C. E., ZHANG, Y. Z., DRESSER, B. L. A Simple Staining Method for Evaluating Acrosomal Status of Cat Spermatozoa. **Journal of Zoo Wildlife Medicine**, v. 22, n. 1, p.87-95, 1991.

RIJSSELAERE, T.; MAES, D.; HOFACK, G.; DE KRUIF, A.; VAN SOOM, A. Effect of Body Weight, Age and Breeding History on Canine Sperm Quality Parameters Measured by the Hamilton-Thorne Analyser. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 2, p. 143-148, 2007.

ROMERO, G. G.; MATTIOLI, G.; ROSA, D.; DIAZ, J. D.; ABEYÁ, M.; GOBELLO, C. A Single Administration of the GnRH Antagonist Acyline Inhibits Basal and GnRH-Stimulated Serum Testosterone Concentration in Male Dogs. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, n. 3, p.32-35, 2011.

ROTA, A.; PEÑA, A. I.; LINDE-FORSBERG, C.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. In Vitro Capacitation of Fresh, Chilled and Frozen-Thawed Dog Spermatozoa Assessed by the Chlortetracycline Assay and Changes in Motility Patterns. **Animal Reproduction Science**, v. 57, p. 199-215, 1999.

SARASTE, M. Oxidative Phosphorylation at the Fin de Siècle. **Science**, v. 283, n. 5407, p. 1488-1493, 1999.

SARTORIUS, G.; NIESCHLAG, E. Paternal Age and Reproduction. **Human Reproduction Update**, v. 16, n. 1, p. 65-79, 2010.

SATTARAHMADY, N.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A.; AHMAD, F.; HAKIMELAHI, G.; HABIBI-REZAEI, M.; SABOURY, A.; SHEIBANI, N. Formation of the Molten Globule-Like State During Prolonged Glucation of Human Serum Albumin. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1770, n. 6, p. 933-942, 2007.

SCHMITT, A.; SCHMITT, J.; MUNCH, G.; GASIC-MILENCOVIC, J. Characterization of Advanced Glycation End Products for Biochemical Studies: Side Chain Modifications and Fluorescence Characteristics. **Analytical Biochemistry**, v. 338, n. 2, p. 201-215, 2005.

SHARMA, R.; AGARWAL, A.; ROHRA, V. K.; ASSIDI, M.; ABU-ELMAGD, M.; TURKI, R. F. Effects of Increased Paternal Age on Sperm Quality, Reproductive Outcome and Associated Epigenetic Risks to Offspring. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, n. 35, 2015.

SILVA, L. F. e CARVALHO, L. F. Anatomofisiologia do Aparelho Reprodutor Masculino. **Atualizações na Infertilidade Masculina**, p. 15-19, 2011.

SINGH, R.; BARDEN A.; MORI, T.; BEILIN, L. Advanced Glycation End-Products: a Review. **Diabetologia**, v. 44, n. 1, p. 129-146, 2001.

SLOTTER, E.; NATH, J.; ESKENAZI, B. WYROBEK, A. Effects of Male Age on the Frequencies of Germinal and Heritable Chromosomal Abnormalities in Human and Rodents. **Fertility and Sterility**, v. 81, n. 4, p. 925-943, 2004.

SLOTTER, E.; SCHMID, T.; MARCHETTI, F.; ESKENAZI, B.; NATH, J.; WYROBEK, A. Quantitative Effect of Male Age on Sperm Motion. **Human Reproduction**, v. 21, n. 11, p. 2868-2875, 2006.

SNYDER, P. J.; BHASIN, S.; CUNNINGHAM, G. R.; MATSUMOTO, A. M.; STEPHENS-SHIELDS, A. J.; CAULEY, J. A.; GILL, T. M.; BARRETT-CONNOR, E.; SWERDLOFF, R. S.; WANG, C.; ENSRUD, K. E.; LEWIS, C. E.; FARRAR, J. T.; CELLA, D.; ROSEN, R. C.; PAHOR, M.; CRANDALL, J. P.; MOLITCH, M. E.; CIFELLI, D.; DOUGAR, D.; FLUHARTY, L.; RESNICK, S. M.; STORER, T. W.; ANTON, S.; BASARIA, S.; DIEM, S. J.; HOU, X.; MOHLER, E. R., 3rd; PARSONS, J. K.; WENGER, N. K.; ZELDOW, B.; LANDIS, J. R.; ELLENBERG, S. S. Effects of Testosterone Treatment in Older Men. **The New England Journal of Medicine**, v. 374, p. 611-624, 2016.

SUZUKI-TOYOTA, F.; ITO, C.; MAEKAWA, M.; TOYAMA, Y.; TOSHIMORI, K. Adhesion Between Plasma Membrane and Mitochondria with Linking Filaments in Relation to Migration of Cytoplasmic Droplet During Epididymal Maturation in Guinea Pig Spermatozoa. **Cell and Tissue Research**, v. 341, n. 3, p. 429-440, 2010.

TAM, L. S.; SHANG, Q.; LI, E. K.; WONG, S.; LI, R. J.; LEE, K. L.; LEUNG, Y. Y.; YING, K. Y.; YIM, C. W.; KUN, E. W.; LEUNG, M. H.; LI, M.; LI, T. K.; ZHU, T. Y.; CHUI, R. K.; TSEUNG, L.; YU, S. L.; KUAN, W. P.; YU, G. M. Serum Soluble Receptor for Advanced Glycation End Products Levels and Aortic Augmentation Index in Early Rheumatoid Arthritis – a Prospective Study. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 42, n. 4, p. 333-345, 2013.

TEMPLADO, C.; DONATE, A.; GIRALDO, J.; BOSCH, M.; ESTOP, A. Advanced Age Increases Chromosome Structural Abnormalities in Human Spermatozoa. **European Journal of Human Genetics**, v. 19, n. 2, p. 145-151, 2011.

TERADA, H. Uncouplers of Oxidative Phosphorylation. **Environmental Health Perspectives**, v. 87, p. 213, 1990.

VERNET, P.; AITKEN, R. J.; DREVET, J. R. Antioxidant Strategies in the Epididymis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 216, n. 1–2, p. 31-39, 2004.

VERSTEGEN, J., IIGUER-OUADA, M., ONCLIN, K. Computer Assisted Semen Analyzers in Andrology Research and Veterinary Practice. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 149–179, 2002.

YUAN, S.; ZHENG, H.; ZHENG, Z.; TAY, W. Proteomic Analysis Reveal a Role of Cytoplasmic Droplets as an Energy Source During Epididymal Sperm Maturation. **Plos One**, v. 8, n. 10, p. 1-12, 2013.

8. ANEXOS

8.1. Anexo 1 – Diluidor a base de Tris-Gema-Citrato (BRITO et al., 2017)

Tabela 18 - – Composição do diluidor utilizado no processo de criopreservação de sêmen de cão.
São Paulo, 2017

REAGENTE	100ml
Tris-hidroxi-metil-aminometano (T-6791)	3,1868g
Ácido cítrico mono-hidratado (C-1909)	1,79g
D-frutose (F-2543)	1,136g
Gema de ovo	20ml
Glicerol	5ml
Água destilada	75ml
Gentamicina (G-1264)	500µl

8.2. Anexo 2 – Análise de correlação para o grupo jovem

Tabela 19 - Análise de correlação entre as variáveis de avaliação morfofuncionais e oxidativas do sêmen e hormonais em cães jovens. São Paulo, 2017

	Vol	Asp	Conc	Def Me	Def Ma	Def Tot	Gota Prox	Gota Dis	E/N	POPE	DAB I	DAB II	DAB III	DAB IV
Libido	0,50815 0,1105	-0,19365 0,5683	0,1 0,7699	-0,21189 0,5317	-0,20278 0,5498	-0,2523 0,4542	0,368 0,2655	0 1	0,05058 0,8826	-0,26901 0,4238	0,10092 0,7678	-0,0518 0,8798	-0,25898 0,4419	-0,10595 0,7565
Vol	1	0,19681 0,5619	0,1617 0,6348	-0,18598 0,584	-0,47307 0,1417	-0,42192 0,1962	0,25257 0,4537	0,15661 0,6456	0,53505 0,0899	-0,37282 0,2588	-0,01399 0,9674	0,1005 0,7688	-0,2656 0,4299	-0,30833 0,3563
Asp		1	0,5164 0,1039	-0,27355 0,4157	-0,09817 0,774	-0,19543 0,5647	-0,10181 0,7658	-0,06839 0,8416	-0,13059 0,7019	0,10419 0,7605	-0,19543 0,5647	0,50152 0,116	-0,26748 0,4265	0,13678 0,6884
Conc			1	-0,4912 0,1249	-0,13826 0,6852	-0,29818 0,3731	0,04301 0,9001	-0,02889 0,9328	0,13794 0,6859	0,26412 0,4326	-0,01835 0,9573	0,03767 0,9124	-0,33433 0,3149	0,30821 0,3565
Def Me				1	0,19421 0,3865	0,43594 0,0425	0,22133 0,3222	0,56881 0,0057	0,01106 0,961	-0,00176 0,9938	-0,10307 0,6481	-0,15207 0,4993	0,16683 0,4581	0,16543 0,4619
Def Ma					1	0,95127 <.0001	0,03318 0,8835	-0,22276 0,319	-0,49986 0,0178	-0,52608 0,0119	-0,36327 0,0966	0,39221 0,071	0,58452 0,0043	0,21552 0,3354
Def Tot						1	0,14009 0,5341	-0,03509 0,8768	-0,44818 0,0365	-0,48445 0,0223	-0,37289 0,0874	0,36052 0,0993	0,58726 0,0041	0,19797 0,3772
Gota Prox							1	0,13795 0,5404	0,38097 0,0802	0,20667 0,3561	0,33394 0,1288	-0,36753 0,0924	-0,35593 0,104	-0,21147 0,3448
Gota Dis								1	0,26657 0,2304	0,20051 0,371	0,25019 0,2615	-0,28944 0,1914	0,03498 0,8772	-0,15522 0,4904
E/N									1	0,65403 0,001	0,58523 0,0042	-0,69926 0,0003	-0,50709 0,016	-0,34939 0,111
POPE										1	0,67603 0,0006	-0,71976 0,0002	-0,48668 0,0216	-0,49858 0,0182
DAB I											1	-0,82518 <.0001	-0,6668 0,0007	-0,64202 0,0013
DAB II												1	0,59015 0,0038	0,27436 0,2166
DAB III													1	0,2047 0,3608
DAB IV														1

Tabela 19 - Análise de correlação entre as variáveis de avaliação morfofuncionais e oxidativas do sêmen e hormonais em cães jovens. (Continuação) São Paulo, 2017

	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	Lin	Mot	Prog	Rapid	Med	Slow	Static
Libido	-0,3 0,3701	-0,3 0,3701	-0,1 0,7699	-0,05023 0,8834	-0,1 0,7699	-0,30347 0,3643	-0,25057 0,4574	0,40091 0,2217	0 1	0,10116 0,7673	0,3508 0,2902	-0,30068 0,3689	-0,41039 0,21
Vol	0,31413 0,3468	0,31413 0,3468	0,42962 0,1873	0,23203 0,4924	0,03696 0,9141	-0,60982 0,0464	-0,34263 0,3023	0,58339 0,0596	0,20788 0,5396	0,38552 0,2416	-0,07408 0,8286	-0,32411 0,3309	-0,85312 0,0008
Asp	0,1291 0,7052	0,1291 0,7052	0,19365 0,5683	0,16211 0,6339	-0,45185 0,163	-0,29383 0,3805	0,0647 0,8501	0,51758 0,103	0 1	0,09794 0,7745	0,19409 0,5674	-0,45288 0,1619	-0,26491 0,4311
Conc	0,39091 0,2345	0,39091 0,2345	0,41818 0,2006	0,3653 0,2693	0,10909 0,7495	0,12874 0,706	-0,01822 0,9576	0,34169 0,3037	0,28182 0,4011	0,39083 0,2346	-0,14579 0,6689	-0,66971 0,0242	-0,08861 0,7956
Def Me	0,09941 0,6767	0,06471 0,7864	0,06702 0,7789	-0,17243 0,4673	0,13019 0,5843	-0,03195 0,8936	0,14035 0,5551	-0,06131 0,7973	0,06632 0,7812	0,12435 0,6014	-0,3642 0,1144	0,24783 0,2921	-0,04918 0,8369
Def Ma	-0,10072 0,6726	-0,17033 0,4728	-0,06056 0,7998	0,11221 0,6376	-0,39516 0,0846	-0,10299 0,6657	-0,29787 0,2021	-0,64268 0,0022	-0,3922 0,0872	-0,41367 0,0698	-0,11246 0,6369	0,47227 0,0355	0,67276 0,0012
Def Tot	-0,0597 0,8026	-0,13456 0,5717	-0,04789 0,8411	0,04568 0,8483	-0,31169 0,181	-0,0719 0,7633	-0,22091 0,3493	-0,62941 0,0029	-0,35085 0,1293	-0,35443 0,1252	-0,22664 0,3366	0,50249 0,0239	0,61331 0,004
Gota Prox	0,38484 0,0938	0,32868 0,1571	0,35751 0,1217	0,27844 0,2345	0,23724 0,3139	-0,02166 0,9278	-0,05085 0,8314	0,33648 0,1469	0,55337 0,0114	0,58477 0,0068	-0,14264 0,5486	0,07773 0,7446	-0,32753 0,1586
Gota Dis	0,2581 0,2719	0,27941 0,2329	0,15424 0,5162	-0,19289 0,4152	0,29394 0,2084	0,11925 0,6165	0,29748 0,2027	0,18513 0,4346	0,17179 0,4689	0,22347 0,3436	-0,17468 0,4614	0,10254 0,6671	-0,3158 0,175
E/N	0,41447 0,0692	0,52354 0,0178	0,38041 0,098	-0,07582 0,7507	0,88738 <.0001	0,35811 0,1211	0,38374 0,0949	0,66742 0,0013	0,68477 0,0009	0,68807 0,0008	-0,13837 0,5607	-0,09527 0,6895	-0,74669 0,0002
POPE	0,12715 0,5932	0,21082 0,3723	0,11264 0,6363	-0,1555 0,5127	0,67965 0,001	0,52002 0,0188	0,45494 0,0439	0,62518 0,0032	0,57299 0,0083	0,56584 0,0093	0,00955 0,9681	-0,45227 0,0453	-0,57232 0,0084
DAB I	0,24207 0,3038	0,28011 0,2316	0,15478 0,5147	-0,13611 0,5672	0,53908 0,0142	0,43835 0,0532	0,46343 0,0396	0,67423 0,0011	0,71807 0,0004	0,6813 0,0009	-0,03183 0,894	-0,22016 0,351	-0,66566 0,0014
DAB II	-0,43618 0,0545	-0,49395 0,0269	-0,42382 0,0626	-0,10306 0,6655	-0,71424 0,0004	-0,30108 0,1971	-0,2525 0,2828	-0,60898 0,0044	-0,77915 <.0001	-0,78148 <.0001	0,19205 0,4173	0,09258 0,6979	0,66861 0,0013
DAB III	-0,14963 0,5289	-0,16644 0,4831	-0,11352 0,6337	0,01652 0,9449	-0,32062 0,1681	-0,02754 0,9082	-0,19287 0,4153	-0,77979 <.0001	-0,63812 0,0025	-0,65369 0,0018	-0,14937 0,5297	0,39998 0,0806	0,65736 0,0016
DAB IV	-0,00308 0,9897	-0,00847 0,9717	0,07697 0,747	0,25363 0,2806	-0,31174 0,1809	-0,46948 0,0368	-0,50454 0,0233	-0,43116 0,0577	-0,39648 0,0835	-0,33572 0,1479	0,04172 0,8614	0,18698 0,4299	0,4612 0,0407

Tabela 19 - Análise de correlação entre as variáveis de avaliação morfofuncionais e oxidativas do sêmen e hormonais em cães jovens. (Continuação) São Paulo, 2017

	MLAI	MLAL	MIAL	MAI	A P Mit	M P Mit	B P Mit
Libido	0,20412 0,6606	-0,40825 0,3632	0,40825 0,3632
Vol	-0,61791 0,1911	0,70619 0,1168	0,88273 0,0198	-0,88273 0,0198	0,03637 0,9383	-0,05455 0,9075	0,29096 0,5267
Asp	-0,13093 0,8047	0,39279 0,4411	0,65465 0,1583	-0,65465 0,1583	-0,61237 0,1438	0,20412 0,6606	0,20412 0,6606
Conc	-0,08571 0,8717	0,08571 0,8717	0,54286 0,2657	-0,42857 0,3965	0,21429 0,6445	0,42857 0,3374	-0,03571 0,9394
Def Me	0,30992 0,261	-0,44785 0,0941	0,30992 0,261	0,32671 0,2346	0,05778 0,8317	0,04258 0,8756	-0,23265 0,3859
Def Ma	-0,1204 0,6691	0,04317 0,8786	-0,15813 0,5735	0,14299 0,6112	-0,18963 0,4818	-0,48001 0,0599	0,42223 0,1033
Def Tot	-0,0343 0,9034	-0,10208 0,7173	-0,00722 0,9796	0,23488 0,3994	-0,14573 0,5902	-0,41638 0,1087	0,30188 0,2558
Gota Prox	0,49608 0,06	-0,25115 0,3666	-0,02307 0,9349	-0,04041 0,8863	0,4126 0,1122	0,07996 0,7685	-0,31345 0,2371
Gota Dis	0,43457 0,1055	-0,49826 0,0587	0,12853 0,648	0,07147 0,8002	-0,08094 0,7657	-0,17344 0,5206	0,05781 0,8316
E/N	0,475 0,0736	-0,12869 0,6476	0,05357 0,8496	-0,49509 0,0606	0,05298 0,8455	0,65931 0,0055	-0,45916 0,0736
POPE	0,42653 0,1129	-0,12287 0,6627	0,2043 0,4652	-0,23049 0,4085	-0,11382 0,6747	0,64302 0,0072	-0,37547 0,1518
DAB I	0,48159 0,0691	-0,02428 0,9316	-0,09704 0,7308	-0,49911 0,0582	-0,10348 0,7029	0,33408 0,206	0,06209 0,8193
DAB II	-0,48334 0,068	-0,03069 0,9135	-0,14969 0,5944	0,51356 0,0502	0,05362 0,8437	-0,5436 0,0295	0,24574 0,3589
DAB III	-0,46631 0,0798	-0,00824 0,9768	-0,09143 0,7459	0,43836 0,1022	-0,24706 0,3563	-0,51822 0,0397	0,33594 0,2033
DAB IV	-0,1508 0,5916	0,1224 0,6639	0,19678 0,4821	0,12517 0,6567	0,1503 0,5785	-0,16852 0,5327	-0,07743 0,7756

Tabela 19 - Análise de correlação entre as variáveis de avaliação morfofuncionais e oxidativas do sêmen e hormonais em cães jovens. (Continuação) São Paulo, 2017

	Int DNA	Oxi Pt PL	□ Pt PL	Oxi Pt SPTZ	□ Pt SPTZ	TBARS	Testo	E2	AGE PL
Libido	-0,3319	0,5	0,5	0,3	0,5	-0,3	0,5	0,27262	.
	0,4219	0,1173	0,1173	0,3701	0,1173	0,3701	0,1173	0,4173	.
Vol	-0,33539	0,70217	0,6375	0,07391	0,19864	-0,05081	0,24946	-0,10075	0,37422
	0,4167	0,016	0,0349	0,829	0,5582	0,882	0,4595	0,7682	0,2867
Asp	0	0,45185	0,3873	0,06455	-0,2582	0,19365	-0,58095	0	0,81009
	1	0,163	0,2393	0,8504	0,4433	0,5683	0,0609	1	0,0045
Conc	-0,41917	0,47273	0,55455	-0,56364	-0,68182	0,15455	-0,32727	-0,53534	0,24003
	0,3013	0,142	0,0767	0,071	0,0208	0,65	0,3259	0,0897	0,5042
Def Me	0,03745	-0,32747	-0,42378	0,20876	-0,0416	0,04242	-0,04816	0,28883	-0,54022
	0,879	0,3256	0,194	0,3771	0,8618	0,8513	0,8882	0,389	0,1069
Def Ma	0,03636	-0,08296	-0,106	-0,10594	0,3148	0,23156	-0,06452	-0,15831	-0,3851
	0,8825	0,8084	0,7564	0,6567	0,1764	0,2998	0,8505	0,642	0,2718
Def Tot	0,07692	-0,16514	-0,22937	-0,11887	0,29107	0,23846	-0,0734	-0,12006	-0,47516
	0,7543	0,6275	0,4975	0,6177	0,2131	0,2852	0,8302	0,7251	0,1652
Gota Prox	0,05455	0,4158	0,32499	-0,00247	-0,20924	0,14274	0,38234	-0,00261	-0,19042
	0,8245	0,2034	0,3295	0,9917	0,376	0,5263	0,2459	0,9939	0,5982
Gota Dis	-0,19423	-0,183	-0,23115	0,01534	-0,23095	0,05533	0,14447	-0,23107	-0,29916
	0,4256	0,5902	0,4941	0,9488	0,3272	0,8068	0,6717	0,4942	0,4011
E/N	-0,24571	0,41842	0,53337	0,3081	-0,75932	0,37603	0,06437	-0,33595	-0,06231
	0,3106	0,2003	0,0911	0,1863	0,0001	0,0846	0,8509	0,3125	0,8642
POPE	-0,35708	-0,29347	-0,26412	0,32803	-0,62181	0,38086	-0,17119	0,10134	0,15979
	0,1334	0,3811	0,4326	0,158	0,0034	0,0803	0,6148	0,7669	0,6593
DAB I	0,0239	-0,23854	-0,32111	0,38279	-0,52473	0,15319	0,50461	-0,005	-0,10592
	0,9226	0,48	0,3356	0,0958	0,0175	0,4961	0,1134	0,9884	0,7709
DAB II	0,12628	0,08005	0,13185	-0,33679	0,66368	-0,11238	-0,32491	0,21567	0,44307
	0,6064	0,815	0,6992	0,1465	0,0014	0,6185	0,3296	0,5242	0,1997
DAB III	-0,16511	-0,2684	-0,2684	-0,3947	0,33963	0,05681	-0,00942	-0,33121	-0,28629
	0,4993	0,4249	0,4249	0,085	0,1429	0,8017	0,9781	0,3198	0,4226
DAB IV	-0,11856	0,05779	0,17337	-0,24691	0,12694	-0,30071	-0,62604	-0,03676	-0,13506
	0,6288	0,866	0,6102	0,294	0,5938	0,1739	0,0393	0,9145	0,7099

Tabela 19 - Análise de correlação entre as variáveis de avaliação morfofuncionais e oxidativas do sêmen e hormonais em cães jovens. (Continuação) São Paulo, 2017

	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	Lin	Mot	Prog	Rapid	Med	Slow	Static
VAP	1	0,96954 <.0001	0,95374 <.0001	0,56422 0,0096	0,38135 0,0971	-0,07722 0,7463	-0,14156 0,5516	0,27937 0,2329	0,60203 0,005	0,65686 0,0017	-0,48773 0,0291	0,07475 0,7541	-0,40152 0,0793
VSL		1	0,91128 <.0001	0,46536 0,0387	0,54436 0,0131	0,0829 0,7283	-0,01736 0,9421	0,35755 0,1217	0,6609 0,0015	0,69733 0,0006	-0,44831 0,0474	0,02717 0,9095	-0,47015 0,0365
VCL			1	0,7003 0,0006	0,28421 0,2246	-0,18632 0,4316	-0,33057 0,1546	0,19646 0,4064	0,5239 0,0177	0,58274 0,007	-0,54265 0,0134	0,05962 0,8028	-0,3152 0,1758
ALH				1	-0,18524 0,4343	-0,49926 0,025	-0,80499 <.0001	-0,11044 0,643	0,05805 0,8079	0,11401 0,6322	-0,15382 0,5173	0,19048 0,4212	0,04391 0,8542
BCF					1	0,56049 0,0102	0,50265 0,0239	0,61649 0,0038	0,67595 0,0011	0,66491 0,0014	-0,08528 0,7207	-0,09585 0,6877	-0,68784 0,0008
STR						1	0,79315 <.0001	0,19834 0,4019	0,31216 0,1803	0,19597 0,4077	-0,15306 0,5194	-0,321 0,1676	-0,12194 0,6085
Lin							1	0,40877 0,0735	0,38119 0,0973	0,30004 0,1987	-0,0322 0,8928	-0,31439 0,177	-0,34863 0,1319
Mot								1	0,75923 0,0001	0,78189 <.0001	0,24934 0,2891	-0,44957 0,0467	-0,93607 <.0001
Prog									1	0,98377 <.0001	-0,25425 0,2794	-0,15867 0,504	-0,76769 <.0001
Rapid										1	-0,23383 0,3211	-0,17745 0,4542	-0,80068 <.0001
Med											1	-0,14545 0,5406	-0,11381 0,6328
Slow												1	0,23938 0,3094
Static													1

Tabela 19 - Análise de correlação entre as variáveis de avaliação morfofuncionais e oxidativas do sêmen e hormonais em cães jovens. (Continuação) São Paulo, 2017

	MLAI	MLAL	MIAL	MIAI	A P Mit	M P Mit	B P Mit
VAP	0,14286 0,6115	0,24307 0,3827	0,31071 0,2597	-0,56122 0,0295	0,17647 0,5133	0,24412 0,3622	-0,20882 0,4377
VSL	0,3 0,2773	0,07507 0,7903	0,275 0,3212	-0,51653 0,0487	0,16471 0,5421	0,38824 0,1373	-0,30588 0,2493
VCL	-0,025 0,9295	0,35031 0,2005	0,39286 0,1475	-0,48972 0,0639	0,13235 0,6251	0,21471 0,4246	-0,16765 0,5349
ALH	-0,3381 0,2177	0,57117 0,0261	0,06798 0,8098	-0,25694 0,3553	0,14286 0,5976	-0,24153 0,3675	0,02209 0,9353
BCF	0,66429 0,0069	-0,3664 0,1792	0,05357 0,8496	-0,33065 0,2287	0,07647 0,7783	0,74706 0,0009	-0,53529 0,0326
STR	0,32217 0,2416	-0,49644 0,0598	-0,07645 0,7866	0,26234 0,3449	0,11511 0,6712	0,58005 0,0185	-0,35132 0,1821
Lin	0,40897 0,1301	-0,51167 0,0512	-0,09327 0,7409	0,08528 0,7625	0,07386 0,7858	0,44904 0,081	-0,24668 0,357
Mot	0,68097 0,0052	-0,21288 0,4462	0,10188 0,7179	-0,46691 0,0793	0,17231 0,5234	0,55228 0,0265	-0,37261 0,1552
Prog	0,6231 0,0131	-0,23566 0,3978	0,08774 0,7559	-0,32885 0,2314	0,2594 0,332	0,61901 0,0106	-0,46721 0,0681
Rapid	0,64401 0,0096	-0,2068 0,4596	0,15921 0,5709	-0,37422 0,1694	0,23764 0,3755	0,56679 0,0221	-0,43395 0,0931
Med	0,32229 0,2414	-0,00896 0,9747	-0,51925 0,0473	-0,19086 0,4956	-0,07681 0,7774	-0,24668 0,357	0,15805 0,5588
Slow	-0,17595 0,5305	0,0593 0,8337	-0,56374 0,0286	0,04313 0,8787	-0,09756 0,7193	-0,53216 0,0338	0,19808 0,4621
Static	-0,66189 0,0072	0,16922 0,5466	-0,07554 0,789	0,56527 0,0281	-0,08876 0,7438	-0,50297 0,047	0,32249 0,2231

Tabela 19 - Análise de correlação entre as variáveis de avaliação morfofuncionais e oxidativas do sêmen e hormonais em cães jovens. (Continuação) São Paulo, 2017

	Int DNA	Oxi Pt PL	□ Pt PL	Oxi Pt SPTZ	□ Pt SPTZ	TBARS	Testo	E2	AGE PL
VAP	0,03446 0,8955	0,23636 0,4841	0,2 0,5554	-0,26854 0,2663	-0,55551 0,0135	0,14366 0,5457	-0,15455 0,65	-0,72865 0,011	-0,23387 0,5155
VSL	-0,11931 0,6483	0,23636 0,4841	0,2 0,5554	-0,22807 0,3477	-0,66667 0,0018	0,23008 0,3291	-0,15455 0,65	-0,72865 0,011	-0,23387 0,5155
VCL	-0,10086 0,7001	0,55455 0,0767	0,50909 0,1097	-0,24912 0,3037	-0,45088 0,0527	0,12632 0,5957	-0,1 0,7699	-0,62456 0,04	-0,03077 0,9327
ALH	0,03574 0,8917	0,60275 0,0497	0,55708 0,075	-0,35589 0,1348	0,03076 0,9005	-0,13027 0,5841	-0,13699 0,6879	-0,6548 0,0288	0,13581 0,7083
BCF	-0,38377 0,1283	-0,27273 0,4171	-0,18182 0,5926	0,25263 0,2967	-0,79474 <.0001	0,61203 0,0041	-0,22727 0,5015	-0,42629 0,1911	-0,35697 0,3113
STR	-0,17365 0,5051	-0,72189 0,0121	-0,60234 0,0499	0,01154 0,9626	-0,56462 0,0118	0,38101 0,0974	0,0092 0,9786	-0,1404 0,6805	-0,29723 0,4043
Lin	0,12269 0,639	-0,6287 0,0383	-0,56948 0,0674	0,21382 0,3794	-0,4989 0,0297	0,23925 0,3097	-0,00456 0,9894	0,3577 0,2801	-0,01231 0,9731
Mot	-0,06831 0,7945	0,42369 0,1941	0,40091 0,2217	0,42512 0,0696	-0,54633 0,0155	0,34099 0,1412	0,10023 0,7694	0,29809 0,3733	0,74388 0,0136
Prog	0,01356 0,9588	0,21818 0,5192	0,17273 0,6115	0,23003 0,3434	-0,64706 0,0027	0,27023 0,2492	0,38182 0,2466	-0,24288 0,4717	-0,25849 0,4708
Rapid	0,01109 0,9663	0,41382 0,2058	0,36324 0,2722	0,22701 0,35	-0,64233 0,003	0,26988 0,2498	0,25749 0,4446	-0,28831 0,3899	-0,21363 0,5534
Med	0,02347 0,9288	0,03645 0,9153	0,05011 0,8837	0,17686 0,4689	0,21909 0,3675	0,00906 0,9698	-0,10478 0,7591	0,52165 0,0998	0,6093 0,0615
Slow	0,17182 0,5096	-0,34624 0,2969	-0,43736 0,1786	0,03872 0,875	0,34668 0,1459	-0,00604 0,9798	0,02733 0,9364	-0,00248 0,9942	-0,56177 0,091
Static	0,06971 0,7904	-0,44304 0,1723	-0,35443 0,2849	-0,4775 0,0387	0,51634 0,0236	-0,31444 0,1769	-0,2052 0,545	-0,13985 0,6817	-0,43957 0,2037

Tabela 19 - Análise de correlação entre as variáveis de avaliação morfofuncionais e oxidativas do sêmen e hormonais em cães jovens. (Continuação) São Paulo, 2017

	MLAI	MLAL	MIAL	MIAI	A P Mit	M P Mit	B P Mit
MLAI	1	-0,71671 0,0026	-0,15 0,5936	-0,01609 0,9546	0,13571 0,6296	0,38571 0,1556	-0,35 0,2009
MLAL		1	0,23771 0,3936	-0,5814 0,023	-0,29312 0,289	-0,23235 0,4047	0,43789 0,1026
MIAL			1	-0,17337 0,5366	-0,18214 0,5159	0,37143 0,1728	-0,02857 0,9195
MIAI				1	0,42181 0,1173	-0,05541 0,8445	-0,37534 0,168
A P Mit					1	0,12059 0,6564	-0,62353 0,0099
M P Mit						1	-0,71176 0,002
B P Mit							1

Tabela 19 - Análise de correlação entre as variáveis de avaliação morfofuncionais e oxidativas do sêmen e hormonais em cães jovens. (Continuação) São Paulo, 2017

	Int DNA	Oxi Pt PL	□ Pt PL	Oxi Pt SPTZ	□ Pt SPTZ	TBARS	Testo	E2	AGE PL
MLAI	-0,29328 0,3089	-0,82857 0,0416	-0,77143 0,0724	0,55604 0,0389	-0,39341 0,164	0,47857 0,0711	-0,2 0,704	0,57977 0,2278	-0,20292 0,6998
MLAL	0,34179 0,2317	0,88571 0,0188	0,77143 0,0724	-0,27063 0,3494	0,022 0,9405	-0,32529 0,2368	0,14286 0,7872	-0,72471 0,1032	0,40584 0,4247
MIAL	-0,27784 0,3362	0,94286 0,0048	1 <.0001	-0,10769 0,714	-0,35385 0,2145	-0,01786 0,9496	-0,2 0,704	-0,7537 0,0835	0,31887 0,5379
MIAI	-0,1479 0,6138	-0,82857 0,0416	-0,77143 0,0724	-0,20022 0,4925	0,51925 0,0571	-0,18052 0,5197	-0,02857 0,9572	0,92763 0,0077	-0,55078 0,2574
A P Mit	0,29623 0,2837	-0,21429 0,6445	-0,07143 0,879	-0,425 0,1143	-0,12857 0,6479	-0,08824 0,7452	0,42857 0,3374	0,22237 0,6317	-0,49281 0,3206
M P Mit	-0,2711 0,3284	0 1	0,07143 0,879	0,26786 0,3344	-0,725 0,0022	0,26765 0,3163	-0,57143 0,1802	-0,57143 0,1802	0,17393 0,7417
B P Mit	0,10952 0,6976	0,14286 0,7599	0,10714 0,8192	0,04286 0,8795	0,44286 0,0983	-0,18529 0,4921	0,35714 0,4316	0,03706 0,9371	0,14494 0,7841
Int DNA	1	-0,52696 0,1796	-0,65869 0,0757	-0,20295 0,4347	0,12915 0,6213	-0,50088 0,0289	0,01198 0,9775	0,36816 0,3695	-0,2364 0,6098
Oxi Pt PL		1	0,96364 <.0001	0,00909 0,9788	-0,01818 0,9577	0,01818 0,9577	0,02727 0,9366	-0,19332 0,569	0,50468 0,1368
□ Pt PL			1	-0,13636 0,6893	-0,14545 0,6696	0,10909 0,7495	0,04545 0,8944	-0,24784 0,4625	0,41851 0,2287
Oxi Pt SPTZ				1	0,09774 0,6818	0,2406 0,3069	0,14545 0,6696	0,9071 0,0001	0,27696 0,4385
□ Pt SPTZ					1	-0,28872 0,217	0,40909 0,2115	0,82779 0,0017	0,02462 0,9462
TBARS						1	-0,37273 0,2589	-0,24288 0,4717	0,28927 0,4176
Testo							1	0,10905 0,7496	-0,44928 0,1927
E2								1	0,15757 0,6638

8.3. Anexo 3 – Análise de correlação para o grupo senil

Tabela 20 - Análise de correlação entre as variáveis de avaliação morfofuncionais e oxidativas do sêmen e hormonais em cães senis. São Paulo, 2017

	Vol	Asp	Conc	Def Me	Def Ma	Def Tot	Gota Prox	Gota Dis	E/N	POPE	DAB I	DAB II	DAB III	DAB IV
Libido	0,64302 0,0328	0,33642 0,3117	-0,11076 0,7458	-0,51757 0,103	-0,0915 0,789	-0,23168 0,493	0,02889 0,9328	-0,15925 0,64	0,67729 0,022	0,45898 0,1556	0,53818 0,0877	-0,08545 0,8027	-0,63856 0,0345	-0,68927 0,019
Vol	1	0,14601 0,6684	-0,17013 0,617	-0,23077 0,4948	-0,41382 0,2058	-0,57376 0,0649	-0,34025 0,3059	-0,18421 0,5877	0,30948 0,3544	0,42191 0,1962	0,54841 0,0807	-0,09557 0,7798	-0,4668 0,1478	-0,67949 0,0215
Asp		1	0,57735 0,0629	0,11708 0,7317	0,17321 0,6105	0,28933 0,3882	0,23094 0,4945	0,55073 0,0791	0,087 0,7992	0,17562 0,6055	-0,0868 0,7997	0 1	-0,26914 0,4235	0 1
Conc			1	0,32722 0,326	0 1	0,1549 0,6493	0,19091 0,5739	0,37578 0,2547	-0,12786 0,7079	0,19818 0,5591	-0,20046 0,5545	0,06452 0,8505	-0,15539 0,6482	0,12683 0,7102
Def Me				1	-0,23378 0,2951	-0,02977 0,8954	-0,14115 0,531	0,65849 0,0009	-0,1244 0,5812	-0,27903 0,2086	-0,05325 0,8139	0,05899 0,7943	0,26458 0,2341	0,09115 0,6867
Def Ma					1	0,93883 <.0001	0,7881 <.0001	-0,01844 0,9351	0,14233 0,5275	-0,1143 0,6125	-0,26119 0,2404	0,18617 0,4068	-0,12544 0,578	0,25172 0,2584
Def Tot						1	0,82063 <.0001	0,15775 0,4832	0,11718 0,6035	-0,14221 0,5278	-0,24171 0,2785	0,09184 0,6844	-0,0847 0,7078	0,34115 0,1202
Gota Prox							1	0,13638 0,5451	0,21999 0,3252	0,03499 0,8771	0,03316 0,8835	-0,00992 0,965	-0,4337 0,0437	0,02741 0,9036
Gota Dis								1	0,14511 0,5194	-0,11209 0,6195	-0,17196 0,4442	0,144 0,5226	-0,05341 0,8134	0,24957 0,2627
E/N									1	0,75846 <.0001	0,41733 0,0533	-0,40329 0,0627	-0,42546 0,0484	-0,425 0,0486
POPE										1	0,55477 0,0074	-0,62237 0,002	-0,51054 0,0152	-0,48037 0,0236
DAB I											1	-0,88234 <.0001	-0,50923 0,0155	-0,87724 <.0001
DAB II												1	0,38354 0,0781	0,61184 0,0025
DAB III													1	0,4922 0,02
DAB IV														1

Tabela 20 - Análise de correlação entre as variáveis de avaliação morfofuncionais e oxidativas do sêmen e hormonais em cães senis. (Continuação) São Paulo, 2017

	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	Lin	Mot	Prog	Rapid	Med	Slow	Static
Libido	0,28894 0,3888	0,32265 0,3332	-0,02408 0,944	0,00726 0,9831	0,04334 0,8993	0,61338 0,0448	0,49345 0,123	0,35718 0,2809	0,10401 0,7609	-0,03371 0,9216	0,37081 0,2616	0,24914 0,46	-0,56825 0,0682
Vol	0,18852 0,5788	0,21611 0,5233	-0,19312 0,5694	0,00231 0,9946	0,26209 0,4362	0,51621 0,104	0,39493 0,2293	0,05991 0,8611	0,09007 0,7923	-0,11035 0,7467	0,21151 0,5324	0,49886 0,1183	-0,469 0,1456
Asp	-0,34641 0,2967	-0,40415 0,2177	0 1	0,40599 0,2154	-0,23094 0,4945	-0,2616 0,4371	-0,348 0,2943	0,63653 0,0352	-0,029 0,9325	0,11547 0,7353	0,28868 0,3893	-0,29 0,387	-0,63509 0,0358
Conc	-0,09091 0,7904	-0,21818 0,5192	0,12727 0,7092	0,33334 0,3165	-0,5 0,1173	-0,19222 0,5712	-0,15525 0,6485	0,70615 0,0152	0,43379 0,1825	0,57273 0,0655	-0,22727 0,5015	-0,7169 0,013	-0,4 0,2229
Def Me	-0,19578 0,3826	-0,25602 0,2501	-0,06 0,7908	0,31207 0,1574	-0,06745 0,7655	-0,30578 0,1664	-0,34642 0,1142	-0,15405 0,4937	-0,21215 0,3432	-0,1454 0,5185	0,17897 0,4255	-0,00315 0,9889	0,10604 0,6386
Def Ma	-0,40894 0,0588	-0,37942 0,0816	-0,47837 0,0243	-0,34986 0,1105	0,1168 0,6047	-0,12869 0,5682	-0,15071 0,5032	-0,12161 0,5898	-0,25326 0,2555	-0,3019 0,1721	0,0396 0,8611	0,29745 0,1788	0,05628 0,8035
Def Tot	-0,41188 0,0568	-0,40385 0,0623	-0,39819 0,0664	-0,21734 0,3312	0,16662 0,4586	-0,23586 0,2906	-0,23548 0,2915	-0,09024 0,6896	-0,21706 0,3319	-0,23258 0,2976	0,04556 0,8405	0,23208 0,2987	0,03055 0,8926
Gota Prox	-0,29598 0,1811	-0,31966 0,147	-0,30608 0,1659	-0,13861 0,5385	0,14092 0,5316	-0,20182 0,3678	-0,14257 0,5268	0,0747 0,7411	-0,08588 0,7039	-0,11051 0,6244	0,14322 0,5249	0,22761 0,3083	-0,12366 0,5835
Gota Dis	0,05492 0,8082	-0,00855 0,9699	0,22159 0,3217	0,50467 0,0166	0,07794 0,7303	-0,22563 0,3127	-0,28363 0,2008	0,1082 0,6317	0,00626 0,9779	0,08134 0,719	0,28619 0,1966	0,18909 0,3994	-0,19008 0,3968
E/N	0,46071 0,0309	0,48545 0,022	0,29556 0,1817	-0,17044 0,4482	0,61334 0,0024	0,62919 0,0017	0,64439 0,0012	0,73601 <.0001	0,63222 0,0016	0,5876 0,004	0,52389 0,0123	0,21093 0,3461	-0,79876 <.0001
POPE	0,52117 0,0129	0,54799 0,0083	0,38388 0,0778	-0,16046 0,4756	0,48339 0,0227	0,53495 0,0103	0,7286 0,0001	0,90402 <.0001	0,86544 <.0001	0,8285 <.0001	0,37898 0,082	-0,01991 0,9299	-0,88982 <.0001
DAB I	0,15308 0,4964	0,20198 0,3674	0,08713 0,6998	-0,15731 0,4844	0,36191 0,0979	0,26606 0,2314	0,45663 0,0327	0,48444 0,0223	0,41667 0,0537	0,38481 0,077	0,48684 0,0216	0,02381 0,9162	-0,49802 0,0183
DAB II	-0,1953 0,3838	-0,24392 0,274	-0,19185 0,3924	0,16643 0,4591	-0,40249 0,0633	-0,19079 0,3951	-0,45875 0,0318	-0,57458 0,0052	-0,54948 0,0081	-0,54535 0,0087	-0,32899 0,1349	0,1721 0,4438	0,54373 0,0089
DAB III	-0,21218 0,3431	-0,21327 0,3406	-0,0751 0,7398	0,05974 0,7917	-0,2248 0,3145	-0,34939 0,111	-0,4584 0,0319	-0,48801 0,0212	-0,43686 0,0421	-0,39223 0,071	-0,38318 0,0784	-0,14476 0,5204	0,51841 0,0134
DAB IV	-0,16762 0,4559	-0,22287 0,3188	0,02622 0,9078	0,1602 0,4764	-0,26056 0,2415	-0,45504 0,0333	-0,54827 0,0082	-0,41393 0,0555	-0,31983 0,1468	-0,26036 0,2419	-0,53723 0,0099	-0,13507 0,549	0,45783 0,0321

Tabela 20 - Análise de correlação entre as variáveis de avaliação morfofuncionais e oxidativas do sêmen e hormonais em cães senis. (Continuação) São Paulo, 2017

	MLAI	MLAL	MIAL	MAI	A P Mit	M P Mit	B P Mit
Libido	-0,22473 0,5325	-0,04495 0,9019	0,62925 0,0513	-0,08989 0,8049	0,04495 0,9019	-0,22473 0,5325	0,13484 0,7103
Vol	0,31098 0,3818	-0,10366 0,7757	0,48172 0,1586	-0,20732 0,5655	-0,10366 0,7757	-0,16464 0,6495	0,22561 0,5308
Asp	-0,28427 0,426	0,2132 0,5543	0,35533 0,3136	-0,4264 0,2191	0,28427 0,426	-0,4264 0,2191	0 1
Conc	-0,11515 0,7514	-0,12727 0,7261	-0,09091 0,8028	-0,21212 0,5563	0,46667 0,1739	-0,35758 0,3104	-0,44242 0,2004
Def Me	0,23361 0,3081	0,25272 0,269	-0,0558 0,8102	-0,32351 0,1526	-0,18439 0,4236	0,04068 0,861	0,11877 0,6081
Def Ma	-0,17106 0,4585	-0,39753 0,0743	-0,04164 0,8578	0,54439 0,0107	0,17886 0,4379	0,10211 0,6596	-0,28683 0,2074
Def Tot	-0,11447 0,6212	-0,30742 0,1752	-0,01236 0,9576	0,40195 0,0709	0,21594 0,3472	0,14049 0,5436	-0,30634 0,1768
Gota Prox	-0,17768 0,441	-0,30697 0,1759	-0,02767 0,9052	0,3495 0,1204	0,17442 0,4495	0,11975 0,6051	-0,30068 0,1854
Gota Dis	-0,10672 0,6452	0,31614 0,1627	0,22134 0,3349	-0,36567 0,1031	0,19851 0,3884	0,13657 0,555	-0,12089 0,6017
E/N	-0,54841 0,01	-0,49334 0,0231	0,59766 0,0042	0,44055 0,0456	0,67771 0,0007	0,36062 0,1083	-0,69006 0,0005
POPE	-0,429 0,0523	-0,66853 0,0009	0,60452 0,0037	0,50409 0,0198	0,7496 <.0001	0,43945 0,0462	-0,80053 <.0001
DAB I	0,0026 0,9911	-0,27669 0,2247	0,40983 0,065	0,12756 0,5816	0,23886 0,2971	0,33388 0,1391	-0,3124 0,168
DAB II	0,09177 0,6924	0,35612 0,1131	-0,51107 0,0179	-0,192 0,4044	-0,43866 0,0467	-0,45558 0,0379	0,5122 0,0176
DAB III	0,17453 0,4492	0,26254 0,2502	-0,15713 0,4964	-0,33589 0,1366	-0,43732 0,0474	-0,10208 0,6597	0,3866 0,0834
DAB IV	-0,04918 0,8323	0,32209 0,1545	-0,36768 0,1011	-0,20067 0,3831	-0,03738 0,8722	-0,22165 0,3342	0,16132 0,4848

Tabela 20 - Análise de correlação entre as variáveis de avaliação morfofuncionais e oxidativas do sêmen e hormonais em cães senis. (Continuação) São Paulo, 2017

	Int DNA	Oxi Pt PL	□ Pt PL	Oxi Pt SPTZ	□ Pt SPTZ	TBARS	Testo	E2	AGE PL
Libido	0,23705	0,53197	0,43818	-0,08668	0,39007	-0,35636	0,02889	-0,46657	0,37617
	0,4828	0,1135	0,2381	0,7999	0,2356	0,2821	0,9328	0,148	0,3584
Vol	0,33257	0,55391	0,36604	-0,02299	0,50118	-0,57475	0,25749	-0,16705	0,11803
	0,3177	0,0966	0,3326	0,9465	0,1163	0,0644	0,4446	0,6235	0,7807
Asp	0,40599	0,59186	0,34641	0,46188	0,46188	0,17321	-0,40415	-0,23307	0,88345
	0,2154	0,0715	0,3611	0,1527	0,1527	0,6105	0,2177	0,4904	0,0036
Conc	-0,0137	0,52727	0,36667	0,1	-0,05455	0,2	-0,30909	0,0367	0,6868
	0,9681	0,1173	0,3317	0,7699	0,8734	0,5554	0,355	0,9147	0,0599
Def Me	-0,14471	0,36426	0,66398	-0,03885	-0,0586	-0,12115	-0,64061	-0,1814	0,56098
	0,5314	0,3008	0,0511	0,8672	0,8008	0,5912	0,0337	0,5935	0,148
Def Ma	-0,09922	-0,56364	-0,53333	-0,19317	0,05203	0,3404	-0,05455	0,09175	0,19279
	0,6687	0,0897	0,1392	0,4015	0,8228	0,1211	0,8734	0,7885	0,6474
Def Tot	-0,15508	-0,57143	-0,51883	-0,1015	-0,04554	0,36934	-0,12301	0,02299	0,18182
	0,5021	0,0844	0,1524	0,6616	0,8446	0,0907	0,7186	0,9465	0,6665
Gota Prox	-0,18354	-0,39394	-0,13333	-0,13342	-0,05207	0,30495	-0,04545	-0,17432	0,32532
	0,4258	0,26	0,7324	0,5642	0,8226	0,1676	0,8944	0,6082	0,4317
Gota Dis	0,12714	0,51035	0,38797	0,24482	0,03187	-0,16175	-0,52031	-0,01167	0,60737
	0,5829	0,1318	0,3022	0,2848	0,8909	0,472	0,1008	0,9728	0,1103
E/N	-0,00065	0,23781	0,18488	-0,08125	-0,59149	0,11924	-0,04566	-0,17051	0,18788
	0,9978	0,5082	0,6339	0,7263	0,0047	0,5971	0,8939	0,6162	0,6559
POPE	0,12102	0,0677	-0,00851	0,00654	-0,74381	0,22033	0,41018	0,21861	-0,09877
	0,6013	0,8526	0,9827	0,9776	0,0001	0,3245	0,2102	0,5184	0,816
DAB I	-0,06987	0,19453	0,00837	-0,02733	-0,4242	0,11429	0,31891	-0,52415	-0,09091
	0,7635	0,5902	0,983	0,9064	0,0553	0,6126	0,3391	0,0979	0,8305
DAB II	0,07871	0,03087	0,2043	-0,11585	0,54605	-0,22298	-0,35026	0,37675	0,24228
	0,7345	0,9325	0,598	0,617	0,0104	0,3186	0,291	0,2534	0,5632
DAB III	-0,04501	-0,12671	0,0532	-0,031	0,12267	0,10205	-0,43321	0,28038	0,01267
	0,8464	0,7272	0,8919	0,8939	0,5963	0,6514	0,1832	0,4037	0,9763
DAB IV	0,0448	-0,5385	-0,4256	0,17395	0,2757	0,02394	-0,03758	0,68266	-0,39597
	0,8471	0,1083	0,2534	0,4508	0,2264	0,9158	0,9127	0,0206	0,3315

Tabela 20 - Análise de correlação entre as variáveis de avaliação morfofuncionais e oxidativas do sêmen e hormonais em cães senis. (Continuação) São Paulo, 2017

	VAP	VSL	VCL	ALH	BCF	STR	Lin	Mot	Prog	Rapid	Med	Slow	Static
VAP	1	0,98503 <.0001	0,89353 <.0001	0,34805 0,1124	0,1565 0,4867	0,64671 0,0011	0,58715 0,0041	0,59605 0,0034	0,78014 <.0001	0,7703 <.0001	-0,06386 0,7777	-0,33447 0,1282	-0,51582 0,014
VSL		1	0,85319 <.0001	0,26478 0,2337	0,2039 0,3627	0,71547 0,0002	0,66308 0,0008	0,60548 0,0028	0,78812 <.0001	0,7664 <.0001	0,00169 0,994	-0,25403 0,254	-0,53601 0,0101
VCL			1	0,51655 0,0138	0,13894 0,5375	0,35234 0,1078	0,27157 0,2215	0,49252 0,0199	0,63932 0,0014	0,67817 0,0005	-0,06158 0,7854	-0,39491 0,0689	-0,37504 0,0855
ALH				1	-0,33871 0,1231	-0,11598 0,6073	-0,18056 0,4213	-0,01104 0,9611	0,02041 0,9282	0,07141 0,7522	-0,03255 0,8857	-0,24518 0,2714	0,03169 0,8887
BCF					1	0,41005 0,058	0,34607 0,1146	0,47542 0,0253	0,41511 0,0547	0,4215 0,0507	0,44758 0,0367	0,36361 0,0962	-0,53898 0,0096
STR						1	0,88602 <.0001	0,53519 0,0103	0,61683 0,0022	0,54874 0,0082	0,28612 0,1967	0,07618 0,7362	-0,55733 0,007
Lin							1	0,65648 0,0009	0,73923 <.0001	0,67016 0,0006	0,28106 0,2051	0,02069 0,9272	-0,67176 0,0006
Mot								1	0,9137 <.0001	0,91316 <.0001	0,39955 0,0654	-0,1528 0,4972	-0,96102 <.0001
Prog									1	0,98725 <.0001	0,11661 0,6053	-0,25028 0,2613	-0,86418 <.0001
Rapid										1	0,11234 0,6187	-0,30944 0,1611	-0,84357 <.0001
Med											1	0,52505 0,0121	-0,48008 0,0237
Slow												1	-0,06565 0,7716
Static													1

Tabela 20 - Análise de correlação entre as variáveis de avaliação morfofuncionais e oxidativas do sêmen e hormonais em cães senis. (Continuação) São Paulo, 2017

	MLAI	MLAL	MIAL	MAI	A P Mit	M P Mit	B P Mit
VAP	-0,35661 0,1126	-0,09974 0,6671	0,39701 0,0747	0,09549 0,6805	0,49821 0,0215	0,40728 0,0669	-0,48133 0,0272
VSL	-0,36234 0,1065	-0,13121 0,5708	0,4378 0,0472	0,15974 0,4892	0,50909 0,0184	0,43766 0,0472	-0,50779 0,0188
VCL	-0,36364 0,1051	0,08834 0,7034	0,37415 0,0947	-0,0974 0,6745	0,45714 0,0372	0,42078 0,0575	-0,41688 0,0601
ALH	-0,02731 0,9065	0,3922 0,0787	0,08228 0,7229	-0,51691 0,0164	-0,02211 0,9242	-0,02536 0,9131	0,1528 0,5085
BCF	0,08574 0,7117	-0,40026 0,0722	0,52047 0,0156	0,31179 0,1689	0,60409 0,0037	0,26372 0,248	-0,51835 0,0161
STR	-0,19713 0,3917	-0,27196 0,233	0,31473 0,1647	0,36619 0,1025	0,41319 0,0626	0,06332 0,7851	-0,34465 0,126
Lin	-0,28962 0,2029	-0,42578 0,0543	0,41048 0,0646	0,4341 0,0493	0,46534 0,0335	0,17638 0,4444	-0,48292 0,0266
Mot	-0,38389 0,0858	-0,51072 0,018	0,61631 0,0029	0,30789 0,1745	0,78857 <.0001	0,41052 0,0645	-0,78142 <.0001
Prog	-0,32151 0,1553	-0,46419 0,034	0,59636 0,0043	0,30394 0,1804	0,79401 <.0001	0,4341 0,0493	-0,77514 <.0001
Rapid	-0,29538 0,1936	-0,39668 0,075	0,57794 0,0061	0,21535 0,3485	0,78074 <.0001	0,42811 0,0529	-0,74626 0,0001
Med	-0,22222 0,333	-0,14365 0,5345	0,32499 0,1506	0,16244 0,4817	0,21248 0,3551	0,21702 0,3447	-0,25601 0,2627
Slow	0,00976 0,9665	-0,07031 0,762	0,22689 0,3226	0,1959 0,3947	-0,01692 0,942	0,00846 0,971	-0,01171 0,9598
Static	0,35076 0,119	0,51592 0,0167	-0,68681 0,0006	-0,30205 0,1833	-0,78012 <.0001	-0,39493 0,0764	0,76323 <.0001

Tabela 20 - Análise de correlação entre as variáveis de avaliação morfofuncionais e oxidativas do sêmen e hormonais em cães senis. (Continuação) São Paulo, 2017

	Int DNA	Oxi Pt PL	□ Pt PL	Oxi Pt SPTZ	□ Pt SPTZ	TBARS	Testo	E2	AGE PL
VAP	-0,00456 0,9843	0,12727 0,7261	-0,18333 0,6368	0,15714 0,4963	-0,40519 0,0684	-0,21632 0,3336	0,56364 0,071	0,25689 0,4457	-0,53016 0,1765
VSL	0,02542 0,9129	0,00606 0,9867	-0,36667 0,3317	0,12987 0,5747	-0,42987 0,0518	-0,2332 0,2963	0,63636 0,0353	0,22019 0,5153	-0,56631 0,1434
VCL	0,04888 0,8334	0,23636 0,5109	0,06667 0,8647	0,29091 0,2008	-0,31818 0,1598	-0,214 0,3389	0,13636 0,6893	0,02752 0,936	-0,22893 0,5855
ALH	0,32528 0,1502	0,5183 0,1248	0,10084 0,7963	0,62545 0,0024	0,26814 0,2399	-0,28458 0,1993	-0,0411 0,9045	0,02304 0,9464	0,40001 0,3262
BCF	-0,21773 0,3431	-0,13939 0,7009	0,13333 0,7324	-0,10393 0,6539	-0,39753 0,0743	0,20051 0,3709	-0,05455 0,8734	-0,29359 0,3809	-0,38557 0,3455
STR	0,0154 0,9472	0,14068 0,6983	-0,05064 0,8971	-0,0875 0,7061	-0,30559 0,1779	-0,29674 0,1799	0,3158 0,3441	-0,15243 0,6546	-0,2439 0,5605
Lin	0,01437 0,9507	-0,15854 0,6618	-0,26051 0,4984	0,00911 0,9687	-0,44893 0,0412	-0,1884 0,4011	0,51599 0,1042	0,10599 0,7564	-0,66062 0,0745
Mot	0,13364 0,5636	0,46809 0,1725	0,1841 0,6354	0,06106 0,7926	-0,69178 0,0005	0,16718 0,4571	-0,05467 0,8732	-0,0046 0,9893	0,72294 0,0427
Prog	0,02122 0,9273	0,01216 0,9734	-0,19247 0,6198	0,0566 0,8075	-0,70592 0,0003	0,09562 0,6721	0,60275 0,0497	0,25807 0,4436	-0,40607 0,3182
Rapid	-0,01501 0,9485	0,16364 0,6515	-0,01667 0,9661	0,10537 0,6494	-0,68878 0,0006	0,09446 0,6759	0,38182 0,2466	0,22937 0,4975	-0,24098 0,5653
Med	0,2478 0,2788	0,35758 0,3104	0,36667 0,3317	0,01365 0,9532	-0,21053 0,3597	-0,15819 0,482	-0,63636 0,0353	-0,56883 0,0678	0,83139 0,0105
Slow	0,1757 0,4462	-0,18237 0,6141	0 1	-0,2317 0,3122	0,05467 0,8139	-0,1041 0,6448	-0,00913 0,9787	-0,13825 0,6852	-0,18788 0,6559
Static	-0,19263 0,4028	-0,44242 0,2004	-0,13333 0,7324	-0,03703 0,8734	0,65021 0,0014	-0,16493 0,4633	-0,01818 0,9577	0,09175 0,7885	-0,62655 0,0965

Tabela 20 - Análise de correlação entre as variáveis de avaliação morfofuncionais e oxidativas do sêmen e hormonais em cães senis. (Continuação) São Paulo, 2017

	MLAI	MLAL	MIAL	MIAI	A P Mit	M P Mit	B P Mit
MLAI	1	0,03053 0,8955	-0,20071 0,383	-0,19481 0,3974	-0,28961 0,2029	-0,25325 0,268	0,4 0,0724
MLAL		1	-0,40416 0,0692	-0,83988 <.0001	-0,46898 0,032	-0,50536 0,0194	0,71842 0,0002
MIAL			1	0,17083 0,4591	0,53069 0,0133	0,48133 0,0272	-0,57421 0,0065
MIAI				1	0,35325 0,1162	0,52468 0,0146	-0,67662 0,0008
A P Mit					1	0,31558 0,1635	-0,81039 <.0001
M P Mit						1	-0,72468 0,0002
B P Mit							1

Tabela 20 - Análise de correlação entre as variáveis de avaliação morfofuncionais e oxidativas do sêmen e hormonais em cães senis. (Continuação) São Paulo, 2017

	Int DNA	Oxi Pt PL	□ Pt PL	Oxi Pt SPTZ	□ Pt SPTZ	TBARS	Testo	E2	AGE PL
MLAI	-0,23481 0,319	0,06667 0,8647	0,07143 0,8665	-0,26015 0,268	0,29624 0,2047	0,22468 0,3275	0,21212 0,5563	-0,34043 0,3358	-0,36037 0,4271
MLAL	0,08573 0,7193	0,43333 0,244	0,30952 0,4556	0,434 0,0559	0,68146 0,0009	-0,60474 0,0037	-0,51515 0,1276	-0,1459 0,6876	0,34236 0,4523
MIAL	0,06042 0,8002	0,55 0,125	0,14286 0,7358	0,09101 0,7028	-0,47161 0,0358	0,17993 0,4351	-0,13939 0,7009	-0,02432 0,9468	0,54056 0,2103
MIAI	-0,1427 0,5484	-0,81667 0,0072	-0,69048 0,058	-0,54737 0,0125	-0,56241 0,0098	0,28312 0,2136	0,41818 0,2291	0,231 0,5208	-0,70273 0,0782
A P Mit	0,17592 0,4582	-0,16667 0,6682	-0,47619 0,2329	0,18346 0,4388	-0,55338 0,0114	0,27403 0,2294	0,28485 0,425	0,43161 0,2129	-0,25226 0,5852
M P Mit	-0,08532 0,7206	-0,21667 0,5755	-0,42857 0,2894	-0,19398 0,4125	-0,67669 0,0011	0,23377 0,3078	0,3697 0,2931	0,10334 0,7763	-0,25226 0,5852
B P Mit	-0,03549 0,8819	0,31667 0,4064	0,35714 0,3851	0,11128 0,6405	0,81353 <.0001	-0,3013 0,1844	-0,35758 0,3104	-0,51672 0,1262	0,05406 0,9084
Int DNA	1	0,14025 0,6992	-0,4622 0,2103	0,23526 0,3046	0,13816 0,5504	-0,08146 0,7256	0,20092 0,5536	0,10599 0,7564	0,21341 0,6118
Oxi Pt PL		1	0,86667 0,0025	0,06667 0,8548	0,45455 0,1869	-0,47879 0,1615	-0,47879 0,1615	-0,33745 0,3403	0,80729 0,0154
□ Pt PL			1	-0,3 0,4328	0,26667 0,4879	-0,28333 0,46	-0,75 0,0199	-0,5594 0,1173	0,56631 0,1434
Oxi Pt SPTZ				1	0,37273 0,0961	-0,31818 0,1598	0,03636 0,9155	0,53213 0,092	-0,0241 0,9548
□ Pt SPTZ					1	-0,43377 0,0495	-0,20909 0,5372	0,08257 0,8093	0,20483 0,6265
TBARS						1	-0,04545 0,8944	-0,28442 0,3966	0,19279 0,6474
Testo							1	0,33029 0,3212	-0,77114 0,0251
E2								1	-0,5309 0,1758

