

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO**

**Adição de vitamina C, ácido ascórbico 2-glicosídeo, α -
tocoferol e ácido docosahexaenoico ao diluidor de
refrigeração do sêmen equino**

Breno Fernandes Barreto Sampaio

CAMPO GRANDE, MS

2015

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO**

**Adição de vitamina C, ácido ascórbico 2-glicosídeo, α -
tocoferol e ácido docosahexaenoico ao diluidor de
refrigeração do sêmen equino**

*Addition of vitamin C, ascorbic acid 2-glucoside, α -tocopherol and
docosahexaenoic acid to the cooling extender of equine semen*

Breno Fernandes Barreto Sampaio

Orientadora: Profa. Dra. Carmem Estefânia Serra Neto Zúccari

Tese apresentada à Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul,
como requisito parcial à obtenção
do título de Doutor em Ciência
Animal.

Área de Concentração: Produção
Animal

CAMPO GRANDE, MS 2015

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha esposa Zenita Lima Corsino, minha mãe Vilma Azevedo Fernandes, meu pai Cosme Cesar Costa Barreto Sampaio (*in memoriam*), minha irmã Dila Fernandes Barreto Sampaio e ao cavalo, que, juntos, me proporcionaram os melhores momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me proporcionado tanta felicidade, ter permitido a realização deste trabalho e por ter sempre permitido conhecer as causas das suas ações na minha vida.

À minha esposa Zenita Lima Corsino pelo apoio em todos os meus empreendimentos, por todo o amor dedicado a mim, por sempre me acalmar e encorajar nas horas de dúvida e por ter prometido ficar sempre ao meu lado. Te amo.

À minha mãe Vilma e minha irmã Dila, que deram a base para que eu me tornasse quem eu sou hoje, proporcionaram tudo o que foi necessário para o meu desenvolvimento intelectual e moral, até que eu pudesse caminhar com minhas próprias pernas.

À minha orientadora e amiga Carmem Estefânia Serra Neto Zúccari, por sempre ter se doado totalmente a todos os seus alunos, orientados ou não, na busca de transmitir incondicionalmente seus conhecimentos tanto na veterinária como em outras áreas que pudessem auxiliar na formação de um cidadão melhor para o nosso país. Tenha certeza que você obteve sucesso nessa missão!

Aos meus amigos de infância “da rua” Guilherme, Cristian, Anderson (Deço), Clayton, Denner (Tata), William (Pina - *in memoriam*), Rennê, Marcelo, Júlio, Valdo e Fábio. Aos amigos do hipismo Tiago Muniz (Ninho), Diego, João Flávio, Alyne, Tiago Minatel, Gustavo (Tião). A todos da VET2000 da UFMS, em especial aos amigos Flávio, William, Cássio e Ana Paula. Aos amigos da música Marcelo, Tiago, Paulo Cezar, Gustavo e Kelson. Aos amigos do Exército Brasileiro, Rudinei, Paulo Sérgio, Fabiano e Coronel Pelégio e família. Aos queridos amigos Robert Schaeffer e toda sua família. Aos novos amigos Carlos Magno e família. Todos tiveram uma grande parcela de ajuda em minha vida.

Aos companheiros de trabalho Edjalma, Érika, Letícia, Bruno pelos bons momentos de convivência mesmo nos maiores apertos durante a condução dos experimentos e pela grande amizade desenvolvida fora do ambiente laboratorial. Pelas novas companheiras Natália, Laura e Maria Gabriela que ajudaram incansavelmente e foram fundamentais para a condução deste trabalho.

Às professoras Eliane Vianna da Costa e Silva e Maria Inês Lenz Souza, por toda a ajuda e sugestões dadas em todas as etapas da minha caminhada na pós-graduação.

Aos meus professores, todos contribuíram de uma forma ou de outra para o meu crescimento.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul por todas as oportunidades.

Aos criadores e aos Médicos Veterinários Daniela Brandão Nunes, Gustavo Ferro e Rodrigo Gassen Tonini pela disponibilização dos garanhões necessários para a realização dos nossos experimentos e à empresa Hayashibara pelo auxílio fornecido.

A todos que contribuíram de alguma forma na realização deste trabalho.

Principalmente ao cavalo, que favoreceu direta ou indiretamente o encontro com a maioria das pessoas citadas nestes agradecimentos, que sempre me motivou a buscar mais conhecimento e que proporcionou muitos momentos agradáveis em sua companhia.

A todos, os meus sinceros agradecimentos.

“Muitos são os que podem entender de cavalos, mas poucos são os capazes de entender os cavalos”.

Itamar Vieira

Resumo

SAMPAIO, B.F.B. Adição de vitamina C, AA2G, α -tocoferol e ácido docosahexaenoico ao diluidor de refrigeração do sêmen equino. 2015. Tese - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2015.

O objetivo da revisão de literatura foi abordar os aspectos relacionados à refrigeração, produção de ROS e o sistema de defesa antioxidante do sêmen equino. O primeiro experimento teve por objetivo avaliar os efeitos da adição dos antioxidantes hidrossolúveis vitamina C (Vit C), ácido ascórbico 2-glicosídeo (AA2G) e do antioxidante lipossolúvel α -tocoferol (α -Toh) ao diluidor, isoladamente e em associação, sobre as variáveis seminais do espermatozoide equino submetido à refrigeração por 72 horas. Na análise da peroxidação lipídica o grupo controle apresentou $2.506,2 \pm 796,4$ ng de MDA x 10^8 espermatozoides, valor que foi significativamente superior aos grupos tratados com os antioxidantes. Os valores médios de motilidade e vigor no grupo AA2G foram, respectivamente, $68,4 \pm 18,1\%$ e $3,7 \pm 0,7$, significativamente superiores aos descritos no grupo controle que apresentou $62,1 \pm 16,2\%$ e $3,4 \pm 0,7$. O segundo experimento avaliou os efeitos da adição do ácido docosahexaenoico (DHA) e do antioxidante lipossolúvel α -tocoferol (α -Toh) ao diluidor, isoladamente e em associação, sobre as variáveis seminais do espermatozoide equino submetido à refrigeração por 72 horas. Não foi observada diferença significativa na motilidade e vigor entre o grupo controle e os grupos tratados com DHA e α -Toh isoladamente, no entanto, a associação dos dois compostos resultou em diminuição dessas variáveis espermáticas. Na análise da peroxidação lipídica o grupo controle apresentou $2.506,2 \pm 796,4$ ng de MDA x 10^8 espermatozoides, valor que foi significativamente superior aos grupos tratados com o DHA e com a α -Toh. Com esta tese de doutorado foi possível concluir que os antioxidantes testados foram eficazes em proteger a célula espermática frente à peroxidação lipídica e que o AA2G pode ter uma dupla função, agindo como antioxidante e como substrato energético para o espermatozoide. Além disso o DHA, apesar de ser um ácido graxo poli-insaturado com alta susceptibilidade à peroxidação, possui um efeito paradoxal no espermatozoide equino, protegendo-o

contra a peroxidação lipídica. Desta forma o AA2G e o DHA se mostram compostos promissor para o uso nas biotécnicas reprodutivas da espécie equina.

Palavras-chave: antioxidantes, espermatozoide, garanhão, lipídeos, PUFA

Abstract

SAMPAIO, B.F.B. Addition of vitamin C, AA2G, α -tocopherol and docosahexaenoic acid to the cooling extender of equine semen. 2015. Tese - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2015.

The objective of this review was to address the issues related to cooling, production of ROS and the antioxidant defense system of equine semen.

The first experiment aimed to evaluate the effects of adding the water-soluble antioxidant vitamin C (Vit C), ascorbic acid 2-glucoside (AA2G) and fat-soluble antioxidant α -tocopherol (α -Toh) to the extender, singly and in combination, on seminal variables of equine sperm submitted to cooling for 72 hours. In the analysis of lipid peroxidation the control group had 2506.2 ± 796.4 ng of MDA $\times 10^8$ sperm, value that was significantly higher than the groups treated with antioxidants. The average values of motility and vigor in AA2G group were, respectively, $68.4 \pm 18.1\%$ and 3.7 ± 0.7 , significantly higher than those described in the control group with $62.1 \pm 16.2\%$ and 3.4 ± 0.7 . It was concluded that the antioxidants protected the sperm cell to lipid peroxidation and the AA2G may have a dual role, acting as an antioxidant and as an energy substrate for the sperm. The second experiment evaluated the effects of adding docosahexaenoic acid (DHA) and fat-soluble antioxidant α -tocopherol (α -Toh) to the extender, singly and in combination, on seminal variables of equine sperm submitted to cooling for 72 hours. There was no significant difference in motility and vigor between the control group and the groups treated with DHA and α -Toh alone, however the association of the two compounds resulted in decreasing of these sperm variables. The analysis of lipid peroxidation the control group showed 2506.2 ± 796.4 ng of MDA $\times 10^8$ sperm, a value which was significantly higher than the groups treated with DHA and the α -Toh, showing that DHA, although a polyunsaturated fatty acid with high susceptibility to peroxidation, exerted an antioxidant effect, protecting the plasma membrane against the deleterious effects of oxidative stress.

Keywords: antioxidants, lipids, PUFA, spermatozoa, stallion

Lista de ilustrações

Figura 1 - Etapas do processo de redução do oxigênio no metabolismo oxidativo, com a geração das ROS ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^\cdot), resultando na produção de água (H_2O). Fonte: Nordberg e Arnér (2001).....	13
Figura 2 - Sítios oxidáveis da molécula L-ácido ascórbico. Fonte: Han et al. (2012).....	21
Figura 3 - Molécula de ácido ascórbico 2-glicosídeo. Fonte: Han et al. (2012).....	22
Figura 4 - Estrutura química das moléculas de tocoferol e tocotrienol. Fonte: Rizvi et al. (2013).....	23
Figura 5 - Elongação e dessaturação do ácido α -linolênico para a formação do ácido docosahexaenoico. Adaptado de Nakamura & Nara (2003) e Simopoulos (2011).....	25
Figura 6 - Ácido docosahexaenoico em diferentes conformações espaciais. Fonte: Garwisch et al. (2003).....	26

Lista de tabelas

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Variáveis do sêmen equino (n = 20) acrescido de antioxidantes e submetido à refrigeração a 5°C por 72 h em função dos momentos avaliados..... **50**

Tabela 2 - Variáveis avaliadas no sêmen equino diluído (n = 20) acrescido de antioxidantes e submetido à refrigeração a 5°C por 72 h..... **51**

CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Variáveis do sêmen equino (n = 20) acrescido de antioxidantes e submetido à refrigeração a 5°C por 72 h em função dos momentos avaliados..... **68**

Tabela 2 - Variáveis avaliadas no sêmen equino diluído (n = 20) acrescido de antioxidantes e submetido à refrigeração a 5°C por 72 horas **70**

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....	1
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Refrigeração do Sêmen Equino.....	2
2.2 Membrana Plasmática.....	4
2.3 Metabolismo Esperático.....	7
2.4 Plasma Seminal.....	9
2.5 Efeito da Refrigeração na Célula Esperática.....	10
2.5.1 Comportamento da membrana plasmática frente à refrigeração.....	10
2.5.2 Efeito da refrigeração no metabolismo esperático.....	11
2.6 Radicais Livres.....	12
2.7 Espécies Reativas de Oxigênio.....	12
2.7.1 Ânion superóxido.....	13
2.7.2 Peróxido de hidrogênio.....	14
2.7.3 Radical hidroxila.....	15
2.8 Peroxidação Lipídica.....	15
2.9 Ação das Espécies Reativas de Oxigênio no DNA Esperático.....	17
2.10 Antioxidantes.....	18
2.10.1 Antioxidantes enzimáticos.....	18
2.10.1.1 Superóxido dismutase.....	19
2.10.1.2 Catalase.....	19
2.10.1.3 Glutathione peroxidase/Glutathione reductase.....	19
2.10.2 Antioxidantes não enzimáticos.....	20
2.10.2.1 Vitamina C.....	20
2.10.2.2 Vitamina E.....	23
2.11 Ácido Docosahexaenoico.....	25
2.12 Considerações Finais.....	28
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
	42
CAPÍTULO 2.....	
Adição de vitamina C, ácido ascórbico 2-glicosídeo e α -tocoferol ao diluidor de refrigeração do sêmen equino.....	42

Introdução.....	43
Material e Métodos.....	45
Resultados.....	49
Discussão.....	52
Referências.....	56
	60
CAPÍTULO 3.....	
Efeito do ácido docosahexaenoico e α -tocoferol no sêmen equino submetido à refrigeração por 72 horas.....	60
Introdução.....	61
Material e Métodos.....	63
Resultados e Discussão.....	67
Referências.....	74
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

O uso de biotécnicas como a inseminação artificial (IA) e a transferência de embriões tornou-se rotineiro na indústria equina brasileira que, apesar de ter pouco mais da metade do rebanho dos EUA, é a líder mundial em produção de embriões (Alvarenga, 2010). Nessas biotécnicas é comum a utilização do sêmen refrigerado.

Devido a alguns entraves observados na IA com sêmen congelado, como o maior custo por prenhez e a baixa resistência do espermatozoide equino ao processo de congelação (Murphy et al., 2014), o sêmen refrigerado vem sendo amplamente utilizado nas últimas décadas. Este método é aceito pela maioria das associações de raça e, embora haja um decréscimo da motilidade após 48 h de armazenamento a 5°C, não há diferença para a taxa de prenhez obtida com o sêmen armazenado por 24 h (Shore et al., 1998). O uso do sêmen refrigerado tem como vantagens eliminar o custo com o transporte dos animais, permitir o envio de uma amostra de sêmen previamente analisada, possibilitar o fracionamento do ejaculado, aumentando o número de éguas inseminadas por garanhão (Graham, 2011; Squires et al., 1999).

A exposição da célula espermática às baixas temperaturas leva a modificações na organização da membrana plasmática (Hammerstedt et al., 1990), o que pode causar o choque térmico pelo frio, resultando em queda da motilidade espermática (Moran et al., 1992).

A presença de ácidos graxos poli-insaturados (*polyunsaturated fatty acids* – PUFA) na membrana favorece a sua fluidez e pode beneficiar a célula durante a refrigeração (Darnell et al., 1990). Porém, o alto conteúdo de PUFA na membrana plasmática (MP) do espermatozoide torna-o vulnerável às mudanças peroxidativas.

A geração de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* - ROS) é consequência do metabolismo oxidativo. Na maioria das espécies, a queda da fertilidade está associada ao estresse oxidativo (EO) que ocorre durante a estocagem seminal, mesmo a baixas temperaturas. Essa diminuição da temperatura, por sua vez, visa à redução do metabolismo e, com isso, o aumento da longevidade espermática (Maxwell e Stojanov, 1996).

Tentando reduzir as injúrias provocadas pelas ROS, pesquisadores buscam formas de manter o equilíbrio da composição do meio diluidor em que se encontram os espermatozoides através da adição de substâncias antioxidantes. Alguns testes foram realizados com vitamina C, catalase (Aurich et al., 1997; Ball et al., 2001), vitamina E, trolox (análogo hidrossolúvel da vitamina E), albumina sérica bovina (Ball et al., 2001), superóxido dismutase, glutathione reduzida (Baumber et al., 2005), ácido ascórbico 2-glicosídeo (AA2G), que é uma forma mais estável do ascorbato (Yoshimoto et al., 2008; Jenkins et al., 2011), hipotaurina e cisteína (Memon et al., 2012).

A associação entre PUFA e antioxidantes parece ser uma opção viável para aumentar a fluidez da membrana plasmática, com a concomitante proteção ao ataque das ROS às duplas ligações desses lipídeos. Assim, a presente revisão aborda os fatores relacionados à refrigeração e adição de antioxidantes ao meio diluidor do sêmen equino.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Refrigeração do Sêmen Equino

A IA com sêmen refrigerado é uma das técnicas mais usadas na rotina reprodutiva da espécie equina, e o Brasil é o segundo país no mundo que mais utiliza essa biotecnologia (Papa et al., 2005). Apesar dos benefícios obtidos com o uso do sêmen refrigerado, alguns ganhões não apresentam bons resultados de fertilidade com a utilização dessa técnica, sendo classificados como “maus resfriadores” (Brinsko et al., 2000).

Um dos fatores que interfere no sucesso das biotécnicas de conservação espermática é a proporção molar de colesterol em relação à de fosfolipídeos (FFL) da MP, que nos equinos é de 0,36, valor intermediário aos encontrados em suínos, de 0,26 e bovinos 0,45 (Parks e Lynch, 1992). O colesterol possui um efeito estabilizador na MP e reduz a temperatura na qual os FFL passam pela transição de fase, ou seja, do estado líquido cristalino para o estado gel (Graham e Foote, 1987; Kirk et al., 2001). A composição lipídica do espermatozoide apresenta diferença entre indivíduos da mesma espécie, o que pode explicar a variação do comportamento desta célula frente à refrigeração, além disso, o aumento da proporção colesterol:FFL confere maior resistência ao espermatozoide refrigerado (Hartwig et al., 2014).

O plasma seminal também pode alterar a resistência espermática ao resfriamento. Altas concentrações de plasma seminal podem ser deletérias ao sêmen resfriado, no entanto, a remoção total do plasma não resulta em maior longevidade seminal (Jasko et al., 1992), embora possa contribuir para a estabilização da membrana e mostrar-se benéfica para ganhões subférteis (Barrier-Battut et al., 2013). A manutenção de uma pequena fração (5 a 20%) do plasma seminal parece proteger a célula espermática contra os danos provocados pelas ROS, e sua função antioxidante pode ser ampliada pela interação com os componentes do diluidor (Kankofer et al., 2005).

A diluição do sêmen visa proporcionar um ambiente favorável para o armazenamento e transporte, evitando a proliferação de microrganismos nocivos, aumentando a longevidade espermática, fornecendo nutrientes e eletrólitos, protegendo contra as substâncias tóxicas produzidas durante o armazenamento e diminuindo as alterações espermáticas causadas pela redução da temperatura (Pickett e Amann, 1987). Visto que o excesso de plasma seminal é deletério ao espermatozoide equino, a concentração final após o acréscimo do diluidor deve estar entre 25 a 50 milhões de espermatozoides/mL. Amostras com concentração

superior a 50 milhões de espermatozoides/mL apresentam redução da motilidade progressiva (Varner et al., 1987).

De forma geral, os contêineres comerciais para transporte de sêmen equino são fabricados para conservar a temperatura a 15°C por até 24 h ou a 5°C por no máximo 48 h. Os ganhões devem ter o sêmen submetido a testes em ambas as temperaturas, visto que alguns animais apresentam fertilidade superior quando estocado a 15°C, enquanto para outros a temperatura de 5°C se mostra mais eficiente (Batellier et al., 2001). Além das diferenças individuais, algumas raças, como o Mangalarga Marchador, podem demonstrar maior sensibilidade à refrigeração (Farrás et al., 2014).

Para reduzir os efeitos nocivos causados pelo choque térmico pelo frio, o sêmen deve ser submetido a uma taxa de resfriamento que minimize esse estresse. Dentre as lesões que o resfriamento pode causar estão a queda da motilidade espermática, movimento anormal do espermatozoide e lesão das membranas e de outros componentes celulares (Aurich, 2005).

A faixa de temperatura em que o espermatozoide se torna mais sensível durante o processo de refrigeração está entre 19 e 8°C. Nesse intervalo a curva de refrigeração deve ser lenta, buscando causar menos danos à MP (Moran et al., 1992). Curvas de resfriamento mais rápidas que -0,9°C/min (Varner et al., 1988) e mais lentas que -0,05°C/min (Douglas-Hamilton et al., 1984) prejudicam a motilidade espermática. Kayser et al. (1992) não encontraram diferença significativa entre as taxas de refrigeração de -0,05 e -0,012°C/min, mas a taxa de -0,3°C/min resultou em queda de motilidade e prejuízo na cinética espermática. A taxa de refrigeração lenta parece proporcionar mais tempo para a reorganização dos lipídeos da membrana plasmática, desta forma, os autores recomendam uma taxa de refrigeração de 0,05°C/min entre as temperaturas de 19 e 8°C (Squires et al., 1999). Os fabricantes de contêineres de transporte do sêmen equino refrigerado buscam respeitar essas taxas de refrigeração (Farrás et al., 2008), que podem ser encontradas tanto em equipamentos que necessitam de alto investimento, como naqueles de menor custo e maior simplicidade (Nunes et al., 2008).

Os reprodutores da espécie equina são escolhidos principalmente pelos resultados obtidos em competições, o que pode acarretar na disseminação de material genético de animais que não apresentam bom desempenho reprodutivo. Com isso, há o surgimento de algumas estratégias para melhorar os resultados dos

garanhões “maus refrigeradores”, como a suplementação, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, com lipídeos e antioxidantes (Brinsko et al., 2005; Cocchia et al., 2011; Contri et al., 2011; Hartwig et al., 2014), buscando modificar a composição da MP do espermatozoide e/ou proporcionar um ambiente menos propenso ao EO, resultando em maior resistência às baixas temperaturas.

2.2 Membrana Plasmática

A MP é a estrutura que define os limites celulares e se apresenta na forma de um mosaico fluido, composto por lipídeos e proteínas que são organizados através de forças não covalentes de características hidrofílicas ou hidrofóbicas (Singer e Nicolson, 1972). As principais classes lipídicas que fazem parte da membrana são os FFL, glicolipídeos e o colesterol. Essas moléculas arranjam-se formando uma dupla camada que não possui geometria fixa, demonstrando ser uma estrutura dotada de fluidez (Quinn, 1989), com espessura média de 50 Å e característica semipermeável (McIntosh, 1999). Devido a esse perfil, os componentes da membrana podem se movimentar lateralmente com certa liberdade no mesmo folheto, porém, alguns fatores podem interferir em sua organização lipídica, como o citoesqueleto (Quinn, 1989) ou, no caso da célula espermática, fenômenos fisiológicos como a capacitação espermática e a reação do acrossomo (Flesch e Gadella, 2000).

Durante a vida do espermatozoide ocorrem mudanças tanto na forma quanto na composição da MP. Durante o trânsito epididimário ocorre a maturação da célula espermática em que, além de modificações estruturais, como a translocação e perda da gota citoplasmática, ocorre também a modificação da composição lipídica e proteica das membranas (Varner e Johnson, 2007).

Os componentes mais abundantes na bicamada lipídica são os FFL que possuem um grupamento polar (hidrofílico) composto por um aminoácido, um fosfato e um glicerol ligado a dois ácidos graxos (AG), formando uma cauda dupla de hidrocarbonetos de característica hidrofóbica (Quinn, 1989). Por esse motivo, os lipídeos agregam-se direcionando as caudas para o interior da bicamada, deixando a região polar voltada para os meios extracelular e citosólico (Singer e Nicolson, 1972).

As espécies de FFL diferem entre si tanto na composição da cabeça polar quanto no tipo de AG que compõe a porção apolar. O FFL mais encontrado na MP é aquele que possui a amina colina ligada ao grupo fosfato – fosfatidilcolina, mas a célula espermática também possui fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol e esfingomielina em sua composição (Parks e Linch, 1992). As moléculas maiores, em sua maioria, localizam-se no folheto externo da bicamada lipídica, dando o aspecto convexo à MP, enquanto que a fosfatidilserina e a fosfatidiletanolamina têm predileção pelo folheto interno (Martin e Pagano, 1987). A esfingomielina, por sua vez, tem menor atração por outro FFL, mostrando afinidade pelas proteínas da MP (Quinn, 1989).

As proteínas representam cerca de 50% do peso da MP e são denominadas de integrais quando essenciais para a estrutura da MP, podendo funcionar também como canais ou receptores para outras moléculas, ou de periféricas quando estão associadas à membrana, mas podem ser facilmente removidas (Amann e Graham, 2011).

Tanto a porção polar dos FFL quanto as proteínas podem se apresentar ligadas a carboidratos, o que aumenta a complexidade dos receptores celulares e, por apresentar carga negativa, favorece a interação com outras proteínas presentes no plasma seminal (Hammerstedt et al., 1990). A composição do glicocálix pode modificar-se de acordo com as características do meio onde o espermatozoide se encontra (Amann e Graham, 2011).

Quando a cauda dos FFL é formada por dois ácidos graxos saturados, tende a proporcionar maior rigidez e organização à MP. Uma maior flexibilidade pode ser obtida quando a cauda do FFL possui um ácido graxo monoinsaturado (*monounsaturated fatty acid* - MUFA) ou um PUFA (Stillwell e Wassall, 2003).

Os lipídeos da membrana podem apresentar três tipos de organização à temperatura fisiológica: 1) bicamada lipídica no estado líquido cristalino; 2) bicamada lipídica em estado gel e, 3) fase hexagonal tipo II, considerada uma camada simples (Quinn, 1989). Os FFL com AG saturados em sua composição apresentam a transição de fase em temperaturas mais elevadas, no entanto, a presença de uma insaturação na cauda hidrocarbonada de um dos AG diminui a temperatura da transição de fase (Chapman et al., 1967). O fato de não haver uma distribuição organizada desses FFL faz com que a membrana se apresente, na maior parte de sua extensão, na forma líquida cristalina à temperatura fisiológica (Quinn, 1989).

A membrana do espermatozoide possui pelo menos três áreas com características conformacionais específicas, que se encontram na região do colo, no *annulus* e longitudinalmente à peça principal. A região pós-acrossomal também é uma região mais estável, visto que se mostra menos susceptível à vesiculações quando ocorre a reação do acrossomo (Amann e Graham, 2011).

O colesterol é de grande importância para a estabilização da MP do espermatozoide (Mocé et al., 2010). Encontra-se entre as caudas dos FFL que compõem a bicamada lipídica e reduz a formação da fase hexagonal do tipo II por FFL através de seu efeito condensador, diminuindo a área ocupada por moléculas que apresentam essa tendência, como a fosfatidiletanolamina. Além disso, o colesterol apresenta maior afinidade pelos fosfolípidos que contêm AG saturados e menor afinidade por aqueles insaturados (Wassal e Stillwell, 2008). Essa predileção forma domínios na MP, denominados de *rafts*, responsáveis por modular alguns eventos celulares, e fazer interação entre proteínas e lipídeos (Pike, 2006). O colesterol pode ser encontrado em altas concentrações na membrana plasmática com valores superiores a 25 mol%, porém, nas membranas de organelas citoplasmáticas como as mitocôndrias essa concentração pode ser inferior a 5 mol% (McIntosh, 1999).

2.3 Metabolismo Espermático

Durante a espermatogênese há a perda de várias organelas e de grande parte do citoplasma, mantendo as estruturas necessárias para a motilidade e a interação com o gameta feminino. Ocorre, também, o remodelamento da cromatina nos estágios finais da espermiogênese, que dá o formato característico da cabeça do espermatozoide, fazendo dele uma célula altamente especializada, com a função de fecundar o ovócito (Varner e Johnson, 2007).

A motilidade auxilia o espermatozoide no trânsito pelo trato genital feminino, e é essencial para que esta célula se desprenda das criptas do epitélio do istmo do oviduto, atinja o local de fecundação e penetre a zona pelúcida. O movimento flagelar é gerado pela enzima dineína ATPase, que desfosforila a molécula de ATP e atua sobre os pares de microtúbulos externos do axonema, causando a movimentação característica da cauda do espermatozoide (Turner, 2003).

Para a geração de ATP o espermatozoide utiliza as vias glicolítica e da fosforilação oxidativa (OXIPHOS – Volpe et al., 2009). O fato de a célula espermática ter poucas organelas faz com que 90% de sua fonte de energia venha do meio extracelular. O espermatozoide consegue metabolizar monossacarídeos como glicose e frutose, apesar de o espermatozoide equino usar a frutose de forma limitada. Outros carboidratos mais complexos não são utilizados como fonte de energia. Além disso, alguns AG e aminoácidos podem ser metabolizados para a geração de ATP (Amann e Graham, 2011).

Os glicídios podem atravessar a MP de forma passiva, porém esse mecanismo é lento e pouco eficaz. Algumas proteínas conhecidas como transportadoras de glicose (*glucose transporters* – GLUT) facilitam a interiorização de hexoses, sem a necessidade de gasto energético. Já foram descritos 14 tipos de GLUT, divididas nas classes I, II e III, e, além de estarem relacionadas com a motilidade espermática, participam de outros eventos que necessitam de energia, como a capacitação e a reação do acrossomo (Bucci et al., 2011). Nos equinos foram descritas GLUT-1, 2, 3, 4 e 5 (Varner et al., 2014).

As mitocôndrias são a principal fonte de ATP e, no espermatozoide, encontram-se na peça intermediária (Peña et al., 2009), em uma disposição espiralada, apresentando aproximadamente 50 giros (Amann e Graham, 2011). A mitocôndria possui duas membranas: a membrana mitocondrial interna e a membrana mitocondrial externa, havendo um pequeno espaço entre elas. De todo o ATP gerado, cerca de 60% é utilizado como energia para força motriz, enquanto que o restante é usado nos processos de fosforilação e desfosforilação dos substratos (Hammerstedt et al., 1988).

As vias da OXIPHOS e da glicólise ocorrem em subcompartimentos distintos. Enquanto a OXIPHOS ocorre nas cristas da membrana mitocondrial interna, a glicólise ocorre nas fibras externas densas do flagelo, que apresentam uma série de enzimas glicolíticas (Ferramosca e Zara, 2014). Mesmo tendo a possibilidade de utilizar tanto o metabolismo anaeróbico quanto o aeróbico, o espermatozoide equino tem maior predileção pela utilização da via aeróbia (Varner et al., 2014), que é mais eficaz quanto à quantidade de ATP gerado (Storey, 2008), mas também produz uma série de metabólitos que resultam na peroxidação da MP se o sistema antioxidante não for capaz de neutralizar esse efeito (Varner et al., 2014).

Para que seja utilizada pelo espermatozoide, a glicose deve ser fosforilada pela enzima fosfohexoisomerase, transformando-se em glicose 6-fosfato (G-6P). A G-6P entra no metabolismo glicolítico gerando piruvato e duas moléculas de ATP. O piruvato pode ser convertido em lactato extracelular ou pode participar do ciclo de Krebs, fazendo o uso da via da OXIPHOS, que também resulta na produção de lactato, mas gera 36 moléculas de ATP, além da formação da molécula de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH – Peña et al., 2009). A NADPH participa da geração da primeira ROS, através da doação de um elétron para o complexo I da matriz mitocondrial. Esse elétron percorre os complexos II, III e IV, sendo transferido para uma molécula de O₂, gerando o ânion superóxido (O₂⁻) com oxidação da NADPH, transformando-a em NADP e prótons de hidrogênio (H⁺). O H⁺ gerado é aproveitado pela enzima ATP sintase (complexo V) da matriz mitocondrial, gerando ATP (Green et al., 2004; Ferramosca e Zara, 2014).

2.4 Plasma Seminal

O plasma seminal é composto por uma mistura complexa de secreções provenientes dos testículos, epidídimos e das glândulas acessórias e, na espécie equina, o espermatozoide vem diluído em grande volume deste líquido (Jobim et al., 2005). Possui uma série de compostos orgânicos e inorgânicos em seu meio, porém, ainda não se sabe a completa composição nem todas as funções das substâncias nele encontradas. Age, por exemplo, como um meio protetor, evitando a ligação de neutrófilos às células espermáticas viáveis através de algumas proteínas e proteases (Troedsson et al., 2005), atua, também, como bactericida, neutraliza alguns metabólitos espermáticos e fornece suporte nutricional ao espermatozoide no trato genital feminino (Pesch et al., 2006). É responsável pela modulação de alguns fenômenos, como a resposta inflamatória do trato genital feminino frente ao ejaculado (Troedsson et al., 2005) e capacitação espermática (Elzanaty et al., 2002; Pesch et al., 2006)

Existe uma alta concentração de proteínas no plasma seminal incluindo enzimas, hormônios, fatores de crescimento, fatores de ligação e imunoglobulinas (Frazer e Bucci, 1996). As proteínas mais abundantes no plasma seminal são as denominadas HSP-1 e HSP-2 (*horse seminal protein*), representando até 80% do

total das proteínas encontradas no plasma seminal de equinos e que têm como característica a capacidade de ligação à heparina (Ekhlesi-Hundrieser et al., 2005). Porém, existe variação individual entre os componentes do plasma seminal e essa diferença pode comprometer a fertilidade do garanhão, principalmente quando submetido às técnicas de conservação seminal (Aurich et al., 1997).

Um estudo utilizando eletroforese bidimensional em gel de poliácridamida buscou correlacionar proteínas seminais com a fertilidade de garanhões. Foram descritas 18 proteínas, sendo que 14 delas eram comuns a todos os garanhões. Foi encontrada correlação ($r = 0,706$; $p < 0,05$) entre a proteína HSP-1 e fertilidade, por outro lado, as proteínas HSP-2, HSP-3 e HSP-4 correlacionaram-se negativamente com fertilidade ($r = - 0,762$; $- 0,730$ e $- 0,775$, respectivamente; $p < 0,05$; Brandon et al., 1999).

O mesmo tipo de análise foi utilizado para verificar a correlação das proteínas do plasma seminal e a resposta à congelabilidade em garanhões. Foram identificados 25 tipos de proteínas, e, da mesma forma, nem todos os animais apresentavam todas as proteínas encontradas. Os garanhões que possuíam boa resistência à congelação mostraram maiores quantidades das proteínas CRISP-3 e SP-2, e os autores concluíram que essas proteínas podem servir como marcadores para a resistência seminal frente à criopreservação (Jobim et al., 2011).

Outros componentes presentes no plasma seminal com grande variação individual são os macro e microelementos. São encontrados no plasma seminal de garanhões: sódio, potássio, cálcio, magnésio, fósforo, cloro, cobre, ferro e zinco. Alguns desses componentes são de grande importância como, por exemplo, o cloro, visto que vários outros cátions correlacionam-se com esse ânion (Pesch et al., 2006), o cálcio, que quando encontrado na forma livre e ionizada pode induzir a reação do acrossoma (Yanagimachi e Usui, 1974) e zinco e cobre, que são encontrados em enzimas como a Cu-Zn-superóxido dismutase, a qual por sua vez, está envolvida com a proteção antioxidante (Pesch et al., 2006).

Além da superóxido dismutase existem outras substâncias no plasma seminal envolvidas com a neutralização de radicais livres, tais como catalase e glutathione peroxidase, vitamina C, vitamina E, glutathione, coenzima Q, taurina, hipotaurina e piruvato (Ball, 2008).

2.5 Efeito da Refrigeração na Célula Espermática

2.5.1. Comportamento da membrana plasmática frente à refrigeração

Com a diminuição da temperatura ocorre a desaceleração da movimentação lateral dos lipídeos no folheto da MP, devido à força de atração de van der Waals que deixa os AG mais próximos, iniciando, assim, a transição de fase entre o estado líquido cristalino e o estado gel (Graham, 2011).

Quando a célula espermática é exposta à refrigeração e atinge a temperatura de 19°C, os lipídeos que apresentam a transição de fase com temperaturas mais altas começam a mudar de estado físico. Aqueles FFL que têm como característica uma menor afinidade pelo arranjo em dupla camada lipídica e, conseqüentemente associam-se com proteínas, aproximam-se, podendo alterar sua apresentação, resultando em modificações da capacidade funcional da MP. Essas associações lipoproteicas vão agregando cada vez mais lipídeos conforme a temperatura diminui, finalizando com toda a MP em estado gel à temperatura de 8°C (Hammerstedt et al., 1990).

Nessa faixa de temperatura, o espermatozoide torna-se mais susceptível ao choque térmico pelo frio, podendo resultar na ruptura da membrana, perda de lipídeos para o meio extracelular, movimento circular e perda de motilidade (Douglas-Hamilton et al., 1984).

A composição da MP determina a temperatura da transição de fase (Darnell et al., 1990), ou seja, uma maior quantidade de PUFA mantém esta estrutura no estado líquido-cristalino em temperaturas mais baixas em relação às membranas com conformação mais rígida. A adição de lipídeos no diluente promove a incorporação destes na membrana (Nasiri et al., 2012; Towhidi e Parks, 2012) e pode melhorar as variáveis seminais após a incubação (Takahashi et al., 2012).

2.5.2. Efeito da refrigeração no metabolismo espermático

Logo após a ejaculação, o espermatozoide apresenta 100% de sua capacidade metabólica. À temperatura ambiente, não há grandes diminuições dessa taxa metabólica. Conseqüentemente, se o sêmen não for submetido à refrigeração, ocorre a acidificação do meio devido à produção de ácido láctico e/ou CO₂ e aumento da peroxidação lipídica, reduzindo, então, sua longevidade (Amann e Graham, 2011).

Há uma diminuição metabólica de 50% a cada 10°C de redução da temperatura, isso significa que o sêmen mantido a 15°C utiliza cerca de 25% da sua capacidade metabólica, enquanto a conservação a 5°C reduz este gasto a aproximadamente 8% (Squires et al., 1999). Porém, ocorre também a diminuição da atividade dos componentes da MP, como, por exemplo, as proteínas estruturais, o que pode promover a entrada deficiente de nutrientes ou remoção inadequada de produtos tóxicos do interior da célula, principalmente se a mesma for mantida entre as temperaturas de 0 e 2°C, resultando em perda da motilidade e viabilidade (Moran et al., 1992; Graham, 2011).

O armazenamento por longos períodos, mesmo com a diminuição do metabolismo, leva a uma maior geração de ROS e, sem uma proteção adequada de antioxidantes extracelulares, pode resultar em lesões oxidativas irreversíveis, como danos à integridade do DNA e à funcionalidade do espermatozoide (Varner et al., 2014). Baseado nisso, a busca de um antioxidante eficaz se faz necessária para proteger os espermatozoides frente aos efeitos nocivos do EO (Varner et al., 2014).

2.6 Radicais Livres

Radicaís livres são substâncias altamente reativas e instáveis que, por apresentarem um ou mais elétrons desemparelhados na última camada, tendem a se ligar a outro elétron buscando alcançar a estabilidade. As reações envolvidas são do tipo oxirredução, ou seja, ao doar um elétron o composto torna-se oxidado e recebendo um elétron torna-se reduzido (Ferreira e Matsubara, 1997).

A geração de radicaís livres tem início através do metabolismo oxidativo que acontece nas mitocôndrias. No processo de geração de energia pode ocorrer a perda de prótons, que serão usados para a produção de ROS ou espécies reativas de nitrogênio (*reactive nitrogen species* – RNS). Além dos radicaís livres, outras substâncias reativas também podem ser formadas que, por não terem elétrons desemparelhados na última camada, não são considerados radicaís livres (Silva, 2006).

Diversas estruturas subcelulares, como proteínas e lipídeos da membrana, podem servir como substrato para produção de radicaís livres, que, apesar de terem meia vida curta, apresentam efeitos deletérios sobre mecanismos celulares, podendo resultar em lesão e morte da célula (Souza e Ferreira, 2007).

2.7 Espécies Reativas de Oxigênio

As ROS são todos os radicais e não radicais derivados do oxigênio. Essas substâncias participam de algumas funções fisiológicas do espermatozoide, como, por exemplo, a capacitação espermática, a reação do acrossomo e a interação entre o espermatozoide e o ovócito (Burnaugh et al., 2007), mas, quando ultrapassam o limiar de neutralização do sistema antioxidante, no EO, causam diminuição de motilidade e da viabilidade espermática (Aitken et al., 2014; Varner et al., 2014).

Em humanos, o EO está entre as principais causas de infertilidade (Agarwal et al., 2014; Aitken et al., 2014), porém em equinos foi encontrada uma correlação negativa entre fertilidade e a porcentagem de células vivas sem dano oxidativo. Gibb et al. (2014) compararam dois grupos de éguas cobertas por garanhões Puro Sangue Inglês, sendo o primeiro grupo composto pelas gestantes após 14 dias da cobertura e o segundo grupo pelas que não conceberam. O sêmen que resultou em prenhez, e conseqüentemente considerado de maior fertilidade, apresentou maior quantidade de danos celulares induzidos por ROS e menor viabilidade espermática. Os autores concluíram que as ROS, em níveis subclínicos, parecem ser benéficas ao espermatozoide, mas que a presença de antioxidantes no sêmen também é necessária para evitar a produção excessiva do ânion superóxido.

Apesar da relação entre a produção de ROS e a fertilidade ainda não estar totalmente elucidada, nos casos em que a célula espermática é submetida ao armazenamento, a presença das ROS resulta em danos oxidativos irreversíveis, lesão de DNA e diminuição da funcionalidade espermática devido à redução extracelular de antioxidantes para a proteção contra os radicais livres e aldeídos lipídicos (Varner et al., 2014).

Normalmente, o metabolismo aeróbio se dá em quatro etapas e, em cada uma delas, há a redução de um elétron. Essas reações iniciam com o O_2 recebendo um elétron, transformando-se no ânion superóxido (O_2^-) e terminam com a produção de H_2O (Figura 1; Nordberg e Arnér, 2001).

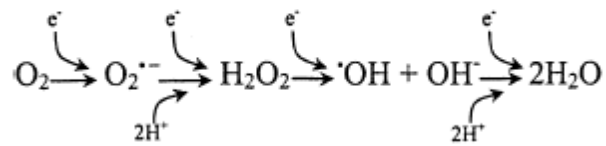


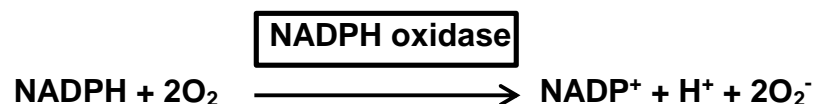
Figura 1. Etapas do processo de redução do oxigênio no metabolismo oxidativo, com a geração das ROS ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($\cdot OH$), resultando na produção de água (H_2O). Fonte: Nordberg e Arnér (2001)

2.7.1 Ânion superóxido

O $O_2^{\bullet -}$ é o primeiro radical livre formado pelo metabolismo oxidativo. Possui meia-vida curta, sendo rapidamente dismutado em peróxido de hidrogênio (H_2O_2 – Burnaugh et al., 2007). Este ânion possui pouca permeabilidade frente às membranas, tornando-se lesivo apenas no compartimento onde é produzido.

No espermatozoide, a produção de $O_2^{\bullet -}$ deriva de uma enzima dependente de cálcio do tipo NADPH oxidase específica dessa célula chamada NOX5 que, além de estar presente na mitocôndria, também pode ser encontrada na membrana plasmática, com grandes concentrações dessa enzima na região acrossomal (Sabeur e Ball, 2007).

A produção de $O_2^{\bullet -}$ se dá através da seguinte reação química (Nordberg e Arnér, 2001):



2.7.2. Peróxido de hidrogênio

O H_2O_2 é uma molécula mais estável que o $O_2^{\bullet -}$, além de ser um composto mais permeável, passando pelas membranas com maior facilidade (Baumber et al., 2000). Este fato se mostra importante, pois significa que essa ROS não se limita a permanecer no compartimento onde foi produzida.

Por não possuir nenhum elétron desemparelhado, o H_2O_2 não é classificado como um radical livre, porém possui grande reatividade, podendo causar danos à

célula espermática. No espermatozoide equino, o estresse oxidativo causado por essa ROS está relacionado com a diminuição da motilidade e aumento da fragmentação do DNA (Baumber et al., 2003).

Para a geração de H_2O_2 é necessária a ação da enzima superóxido dismutase (SOD), que catalisa a reação química envolvendo o O_2^- e H^+ , gerando H_2O_2 e O_2 (Nordberg e Arnér, 2001; Silva, 2006).



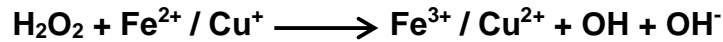
Outra forma de gerar H_2O_2 é através da redução espontânea do radical hidroperóxido (HO_2). O HO_2 é a forma protonada do radical superóxido e possui uma ação oxidante mais forte, atacando prontamente os PUFA's (Bielski et al., 1983). Subcompartimentos celulares com maior concentração de prótons, como o espaço entre as membranas mitocondriais, favorecem a formação dessa ROS. A conversão do HO_2 em H_2O_2 se dá conforme a seguinte reação (Silva, 2006):



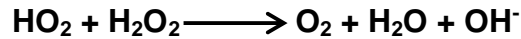
Além de afetar a célula espermática diretamente, o H_2O_2 atua também na formação de outros compostos reativos como o ácido hipocloroso (HOCl) e o radical hidroxila (OH^- ; Nordberg e Arnér, 2001). O HOCl é produzido, em sua maior parte, por neutrófilos, sob a ação da enzima mieloperoxidase que, por sua vez, é ativada pelo complexo NADPH. A ação do HOCl sobre os espermatozoides pode ser observada em casos de inflamação do trato genital masculino (Leβiq et al., 2005), atacando as duplas ligações dos ácidos graxos insaturados ligados aos fosfolípidos da membrana (Arnhold et al., 2001; Arnhold et al., 2002).

2.7.3. Radical hidroxila

O OH^- é considerado a ROS mais lesiva aos sistemas biológicos devido ao seu alto poder de reatividade (Betteridge, 2000). É formado a partir do H_2O_2 através da reação de Fenton, que é catalisada por íons metálicos como Fe^{2+} ou Cu^+ geralmente ligados a proteínas ou outras moléculas (Nordberg e Arnér, 2001).



A reação descrita por Haber e Weiss (1932) também pode acarretar na formação do radical hidroxila:



A peroxidação lipídica (LPO), depois de iniciada na presença do OH^- , acontece como uma reação em cascata, necessitando da presença do íon Fe^{2+} (Ball e Vo, 2002).

2.8 Peroxidação Lipídica

A grande quantidade de PUFA's na membrana plasmática a torna susceptível à LPO, que é caracterizada por uma sequência de eventos bioquímicos iniciados devido ao estresse oxidativo, resultando na formação de peróxidos, como, por exemplo, o hidroperóxido lipídico, e de aldeídos citotóxicos, como o malondialdeído (Aitken, 1995).

A LPO altera a fluidez da membrana, o que pode interferir em eventos importantes relacionados à fecundação, como a reação do acrossomo. A diminuição da fluidez pode impedir a fusão entre as membranas plasmática e acrossomal externa, comprometendo a liberação das enzimas acrossomais, prejudicar a expressão de receptores celulares e aumentar a permeabilidade a alguns íons (Sanocka e Kurpysz, 2004).

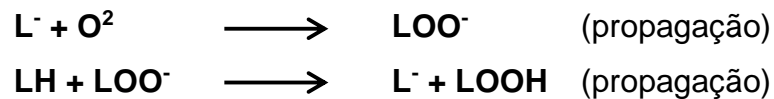
Os PUFA's apresentam duplas ligações em sua cadeia hidrocarbonada e essa característica enfraquece a ligação entre o carbono e o hidrogênio do grupo metil adjacente, tornando o hidrogênio susceptível à captação por qualquer composto que apresente um elétron desemparelhado na última camada, ou seja, o radical livre busca a estabilização eletrônica, e isso é possível através da retirada de um átomo de hidrogênio do fosfolípideo da membrana. Até 60% dos ácidos graxos da MP podem ser danificados pela LPO (Agarwal et al., 2014).

A LPO é dividida em três etapas: iniciação, propagação e terminação. A iniciação é caracterizada pela retirada de um átomo de hidrogênio da dupla ligação

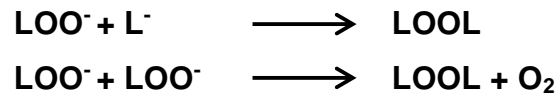
de um ácido graxo insaturado (LH) pelo radical hidroxila, resultando na formação de radical lipídico (L[•]) e água (Ferreira e Matsubara, 1997; Agarwal et al., 2014).



A segunda etapa é a propagação em que o radical lipídico reage com o oxigênio, formando o radical peroxil (LOO[•]), o qual atrai o hidrogênio dos outros lipídeos que ainda não sofreram peroxidação numa reação catalisada pelos íons Fe²⁺ ou Cu⁺. Essa reação resulta na formação de L[•] e hidroperóxido lipídico (LOOH; Ferreira e Matsubara, 1997).



A estabilização acontece na fase de terminação, quando o LOO[•] liga-se a um L[•] ou a outro LOO[•] formando uma cadeia de dois lipídeos unidos pelo oxigênio:



O hidroperóxido lipídico pode ser convertido em alcoxila e peroxila. A reação também se dá na presença de íons metálicos, originando esses radicais livres que possuem alta reatividade e iniciam novas ramificações na cadeia de reações da LPO (Agarwal et al., 2014). No final, essas reações resultam na produção de malondialdeído, que pode ser mensurado para a verificação do grau de peroxidação sofrido pelo espermatozoide, além de outro composto chamado 4-hidroxinonal, formado por lipoproteínas de baixa densidade (Sanocka e Kurpisz, 2004).

2.9 Ação das Espécies Reativas de Oxigênio no DNA Espermático

A cromatina é composta pelo DNA e pelas proteínas que se ligam a dupla hélice de ácidos nucleicos e, nas células somáticas, as principais proteínas ligadas ao DNA são as histonas. Nos estágios finais da espermatogênese há a substituição das histonas por proteínas de transição e, em seguida, pelas protaminas,

condensando o DNA, favorecido pelas pontes dissulfídicas presentes entre as moléculas. Essa configuração protege o DNA contra os danos oxidativos (Schulte et al., 2010).

Em alguns casos, a protaminação da cromatina pode ocorrer de forma incorreta ou incompleta, deixando o DNA mais susceptível ao EO, resultando na fragmentação e rearranjo das ligações (Duru et al., 2000). Alguns testes laboratoriais são capazes de detectar a fragmentação do DNA da célula espermática, tais como a coloração pelo azul de toluidina, sondas fluorescentes como o *acridine orange*, testes de TUNEL e cometa. Recentemente, foi descrito um marcador de fragmentação de DNA causada por EO: 8-hidroxi-2-desoxiguanosine (8OHdG – González-Marin et al., 2012).

A fragmentação do DNA aumenta quando o espermatozoide é submetido ao resfriamento (Linfor e Meyers, 2002) e a ROS que está mais relacionada com esse tipo de lesão é o H₂O₂ (Baumber et al., 2000; Baumber et al., 2003).

A senescência ou a ausência da função espermática podem levar à apoptose. Em células somáticas a apoptose é associada à fragmentação do DNA devido à liberação de nucleases oriundas da mitocôndria e/ou ativadas no citosol. Porém, nos espermatozoides, o núcleo é fisicamente separado das mitocôndrias, por isso, mesmo havendo a produção de nucleases, não é possível a entrada desses compostos no envelope nuclear, ficando retidas na peça intermediária. Desta forma, as substâncias apoptóticas produzidas pelas mitocôndrias que afetam o DNA são as ROS derivadas do metabolismo oxidativo e as nucleases atuam no momento próximo à morte celular (Koopers et al., 2011; Aitken et al., 2014).

A célula espermática possui uma enzima incorporada à estrutura nuclear chamada 8-oxoguanina glicosilase 1 (OGG1). Frente ao ataque das ROS, essa enzima liga-se à 8OHdG levando a base oxidada para o meio extracelular, deixando um sítio livre para a reparação nuclear. Porém, o espermatozoide não possui a enzima responsável por essa reparação, sendo assim, esse processo só pode ser finalizado quando ocorre a fecundação, com o ovócito restabelecendo a ligação dissulfeto (Smith et al., 2013). Essa reparação pode ser feita até a fase de blastocisto, sem consequências para o desenvolvimento embrionário ou fetal (González-Marin et al., 2012).

2.10 Antioxidantes

Os antioxidantes são substâncias capazes de proteger as células e organismos contra os efeitos deletérios causados pelo EO através da neutralização das ROS, tendo a H₂O como produto final. Os antioxidantes podem ser divididos em dois grupos: enzimáticos e não enzimáticos (Nordberg e Arnér, 2001).

A proteção contra o EO se dá de duas formas na célula espermática, a primeira é através da condensação da cromatina, ficando, desta forma, minimamente exposta ao ataque das ROS e, a segunda linha de defesa contra os radicais livres são os antioxidantes encontrados no plasma seminal, que mantêm a produção de ROS em níveis fisiológicos (Agarwal et al., 2014).

2.10.1 Antioxidantes enzimáticos

Os antioxidantes enzimáticos fazem parte do primeiro sistema de defesa que atua contra o excesso de ROS. Fazem parte desse grupo a superóxido dismutase, a catalase e o sistema glutathiona peroxidase/glutathiona redutase (Nordberg e Arnér, 2001; Agarwal et al., 2014).

2.10.1.1 Superóxido dismutase

A SOD possui três isoformas: Cu/Zn-SOD encontrada no citosol, Mn-SOD encontrada nas mitocôndrias e Cu/Zn-SOD presente no meio extracelular.

A forma mitocondrial da SOD é encontrada em grandes quantidades nessa organela devido à abundância de elétrons que são gerados no metabolismo oxidativo (Weisinger e Fridovich, 1973). A adição de SOD ao sêmen equino aumenta a fragmentação do DNA, devido à formação de H₂O₂ após a neutralização do O₂⁻ (Baumber et al., 2005).

2.10.1.2 Catalase

A catalase combate o peróxido de hidrogênio e inibe a NADPH oxidase, impedindo, então, a formação de O₂⁻ (Silva, 2006).

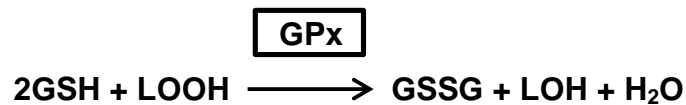


Além da redução indireta do OH⁻ pela inibição do H₂O₂, a catalase atua em diferentes substâncias reativas como fenóis e álcoois (Nordberg e Arnér, 2001;

Agarwal et al., 2014). A adição de catalase ao diluidor de refrigeração não tem efeito significativo nas variáveis motilidade e viabilidade espermática em equinos (Ball et al., 2001)

2.10.1.3 Glutathione peroxidase/Glutathione reductase

A glutathione peroxidase (GPx) protege os espermatozoides contra os efeitos do H_2O_2 , mas também atua contra hidroperóxidos lipídicos e, em ambos os casos utiliza a glutathione reduzida (GSH) como substrato e apresenta a glutathione dissulfeto e água como resultado da reação química (Nordberg e Arnér, 2001; Silva, 2006). A adição de GSH, que não é considerado um antioxidante enzimático, previne a fragmentação do DNA no sêmen equino (Baumber et al., 2003).



A enzima glutathione reductase (GR) recicla o sistema convertendo a glutathione dissulfeto (GSSG) em GSH e as reações que são catalisadas pela GPx e GR são selênio dependentes (Nordberg e Arnér, 2001).

2.10.2 Antioxidantes não enzimáticos

Os antioxidantes não enzimáticos são a vitamina C e a GSH no meio extracelular, vitamina E e coenzima Q nas membranas, e taurina, hipotaurina, e piruvato, que podem ser encontrados tanto no meio extracelular quanto no meio intracelular (Silva, 2006).

2.10.2.1 Vitamina C

A vitamina C é um composto hidrossolúvel e combate a LPO neutralizando o O_2^- , OH^- e hidroperóxidos lipídicos (Silva, 2006), e age sinergicamente com a vitamina E reduzindo o radical α -tocoferil em α -tocoferol (Jialal et al., 1990). É considerado um nutriente essencial, ou seja, o organismo não consegue produzi-lo, devendo ser obtido em alimentos ou suplementos (Rumsey e Levine, 1998).

Esse antioxidante pode ser encontrado em sua forma reduzida, o ascorbato, ou em sua forma oxidada, o ácido desidroascórbico e, além da função protetora, pode funcionar como um pró-oxidante quando em altas concentrações ou na presença de íons metálicos como Fe e Cu, fazendo a reciclagem, tornando-os prontos para atuarem na LPO (Ferreira e Matsubara, 1997).

Apesar de ser um potente antioxidante, a vitamina C é altamente instável em meios aquosos, principalmente sob condições oxidativas como calor, luz, presença de íons metálicos e enzimas como a ascorbato oxidase (Ferreira e Matsubara, 1997; Frei e Lawson, 2008; Yamamoto et al., 1990). Essa instabilidade reduz a atividade biológica desse antioxidante, limitando, assim, o seu uso (Han et al., 2012). A vitamina C possui dois sítios que podem ser oxidados, o que permite a ligação com mais de uma ROS por molécula de ácido ascórbico (Figura 2; Takebayashi et al., 2007a; Han et al., 2012).

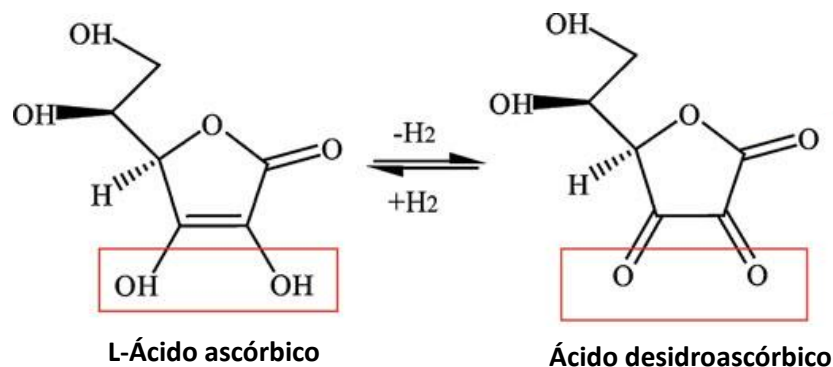


Figura 2. Sítios oxidáveis da molécula L-ácido ascórbico. Fonte: Han et al. (2012)

A adição de vitamina C ao sêmen equino refrigerado e criopreservado tem um efeito protetor sobre a membrana plasmática (Aurich et al., 1997; Franco et al., 2013), porém não tem efeito significativo sobre a motilidade (Aurich et al., 1997; Ball et al., 2001).

Alguns compostos foram desenvolvidos buscando proporcionar maior estabilidade e biodisponibilidade à vitamina C, tais como: ascorbil-fosfato (Okubo et

al., 2012), ascorbil-metil-éter (Lu et al., 1984), ascorbil-glicosídeo (Yamamoto et al., 1990), ascorbil-palmitato (Dresser et al., 2002), entre outros.

O ácido ascórbico 2-glicosídeo (AA2G) é um tipo de ascorbil-glicosídeo, o que significa que em sua estrutura há uma molécula de glicose ligada ao ácido ascórbico na posição 2 (Figura 3; Takebayashi et al., 2006). Essa conformação torna o AA2G mais estável e faz com que a ação deste antioxidante ocorra de forma mais lenta, com maior eficiência e por mais tempo em comparação à vitamina C (Takebayashi et al., 2003). Além disso, o AA2G atua neutralizando uma ROS de forma direta ou pode ser convertido enzimaticamente em vitamina C (Yamamoto et al., 1990, Tai et al., 2002; Takebayashi et al., 2007a).

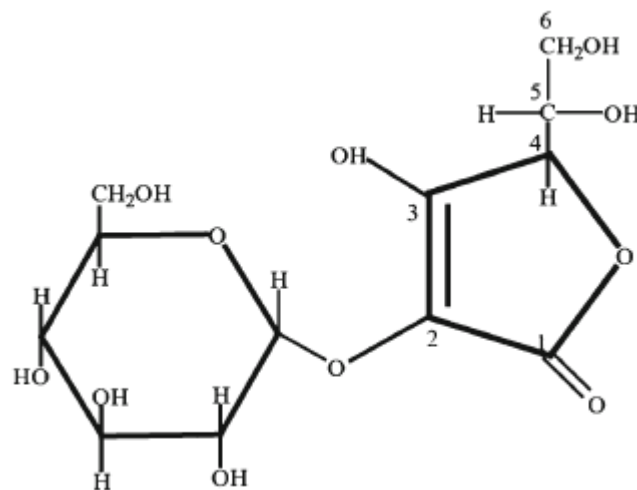


Figura 3. Molécula de ácido ascórbico 2-glicosídeo. Fonte: Han et al. (2012)

A principal utilização do AA2G é feita na indústria de cosméticos (Huang et al., 2013) onde promove a síntese de colágeno pelos fibroblastos dermais (Yamamoto et al., 1992) e inibe a produção de melanina (Kumano et al., 1998), no entanto, vem sendo testado em outras áreas nas quais o controle antioxidante se mostra importante como, por exemplo, em meios de conservação de órgãos transportados para transplante (Arata et al., 2004; Takesue et al., 2003), na conservação de sangue, para evitar a hemólise causada por ROS (Takebayashi et al., 2007b) e maturação *in vitro* de ovócitos, que, após a fecundação, mostrou melhores resultados em comparação à vitamina C e ao β -mercaptoetanol na espécie suína (Tatemoto et al., 2001).

O AA2G tem demonstrado bons resultados quando associado ao sêmen submetido ao armazenamento. A adição de AA2G ao diluidor de congelação de sêmen suíno resultou no aumento significativo da motilidade e integridade de membrana após a descongelação (Yoshimoto et al., 2008). Ao fazer a suplementação *in vitro* com AA2G do sêmen submetido à sexagem, Chunmei et al. (2012) também relataram valores significativamente superiores para motilidade e integridade de membrana após a passagem pelo citômetro de fluxo.

No sêmen humano submetido à congelação, a adição de AA2G mostrou valores significativamente superiores para a variável motilidade após a descongelação (Jekins et al., 2011). Resultados em equinos ainda não foram relatados utilizando o AA2G, tanto no sêmen refrigerado, quanto no criopreservado.

2.10.2.2 Vitamina E

A vitamina E é um composto lipossolúvel descoberto em 1922 por Evans e Bishop (Niki e Traber, 2012). Existem oito formas de vitamina E, sendo elas α , β , γ e δ tocoferóis e α , β , γ e δ tocotrienóis. Os tocoferóis e tocotrienóis apresentam composição semelhante, possuindo uma cadeia lateral hidrocarbonada na posição dois do anel 6-cromanol. Nos tocoferóis essa cadeia hidrocarbonada é saturada, porém, nos tocotrienóis, é insaturada (Figura 4; Rizvi et al., 2014).

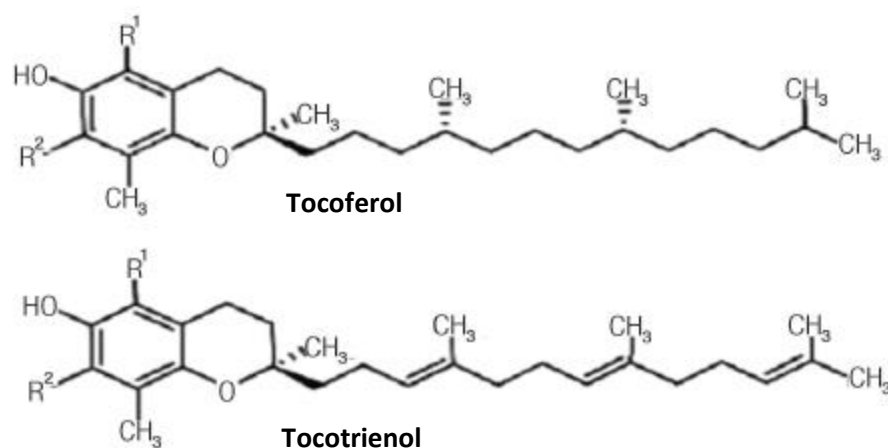


Figura 4. Estrutura química das moléculas de tocoferol e tocotrienol. Fonte: Rizvi et al. (2013)

A vitamina E é um composto essencial, derivado do ácido homogentísico e é encontrada em diversos vegetais, como a soja e o milho, podendo se acumular no

tecido adiposo dos animais. A forma mais abundante e eficaz da vitamina E é o α -tocoferol, e pode ser encontrado no soro e nas hemácias (Chow, 1975), bem como no plasma seminal e na membrana plasmática do espermatozoide (Agarwal et al., 2003; Contri et al., 2011). O α -tocoferol tem afinidade por uma proteína carreadora (*α -tocoferol transfer protein*) e, além disso, as outras formas de tocoferol possuem metabolismo mais rápido, o que pode explicar a maior biodisponibilidade do α -tocoferol (Rizvi et al., 2014).

Essa molécula é capaz de impedir a propagação da reação em cadeia iniciada na LPO, neutralizando de forma eficiente os radicais peroxil, alcoxil e outros compostos lipídicos reativos (Wayner et al., 1987). A vitamina E se liga à membrana plasmática através de sua cadeia hidrocarbonada e, quando encontrada nessa posição confere proteção com maior eficiência, evitando, assim, o ataque dos radicais livres às duplas ligações dos ácidos graxos poli-insaturados da membrana (Tran et al., 1996). Após a neutralização o α -tocoferol se transforma em α -tocoferil, perdendo, assim, seu efeito antioxidante. No entanto, há um efeito sinérgico com outras substâncias, podendo fazer a reciclagem do α -tocoferil em α -tocoferol, tais como a vitamina C (Packer et al., 1979) e a coenzima Q10 (Bowry et al., 1995).

O α -tocoferol também pode auxiliar na estabilização da membrana plasmática, conferindo um aspecto mais organizado, além de reparar lesões nessa estrutura celular no tecido muscular esquelético (Howard et al., 2011).

Os efeitos antioxidantes da suplementação com α -tocoferol vêm sendo estudados em diversos tecidos e patologias como, por exemplo, seu uso no combate à enxaqueca (Bütüm et al., 2014), problemas na mucosa gástrica (Kamisah et al., 2014), estresse oxidativo induzido pelo exercício (Stepanyan et al., 2014), recuperação do tecido muscular (Howard et al., 2011), vários tipos de câncer, doenças cardiovasculares e doença de Alzheimer (Rizvi et al., 2014).

O estudo dos efeitos do α -tocoferol nos espermatozoides é feito tanto através da suplementação *in vivo*, quanto pela adição *in vitro* ao sêmen. A ingestão de vitamina E melhora a qualidade seminal em humanos (Kobori et al., 2014; Nadjarzadeh et al., 2013), touros (Velasquez-Pereira et al., 1998) e equinos (Contri et al., 2011). A adição desse antioxidante ao diluidor de congelação do sêmen proporciona aumento na motilidade e viabilidade espermática após a descongelação do sêmen bovino (Nasiri et al., 2012; Towidhi e Parks, 2012) e, em equinos, foi

observada maior quantidade de espermatozoides integros e diminuição da lipoperoxidação após a descongelação (Franco et al., 2013).

Ball et al. (2001) testaram a adição de α -tocoferol ao sêmen equino refrigerado por até 96 h e não observaram diferença significativa nas variáveis motilidade e integridade da membrana plasmática. Por outro lado, Almeida e Ball (2005), mesmo relatando que não houve melhora na motilidade espermática, verificaram diminuição da peroxidação lipídica com a adição de α -tocoferol ao sêmen equino refrigerado por até 48 h.

2.11 Ácido Docosahexaenoico

O ácido docosahexaenoico (*docosahexaenoic acid* – DHA) é um PUFA n-3 essencial que pode ser encontrado com facilidade nos óleos de peixe, mas que também pode ser metabolizado pelos mamíferos de forma pouco eficiente através da alongação e dessaturação enzimática do ácido α -linolênico (Figura 5; Nakamura e Nara, 2003). O DHA possui 22 átomos de carbono e seis duplas ligações na cauda hidrocarbonada e pode ser rapidamente incorporado nas membranas celulares, aumentando sua fluidez pela formação de domínios mais desordenados (Wassall e Stillwell, 2009).

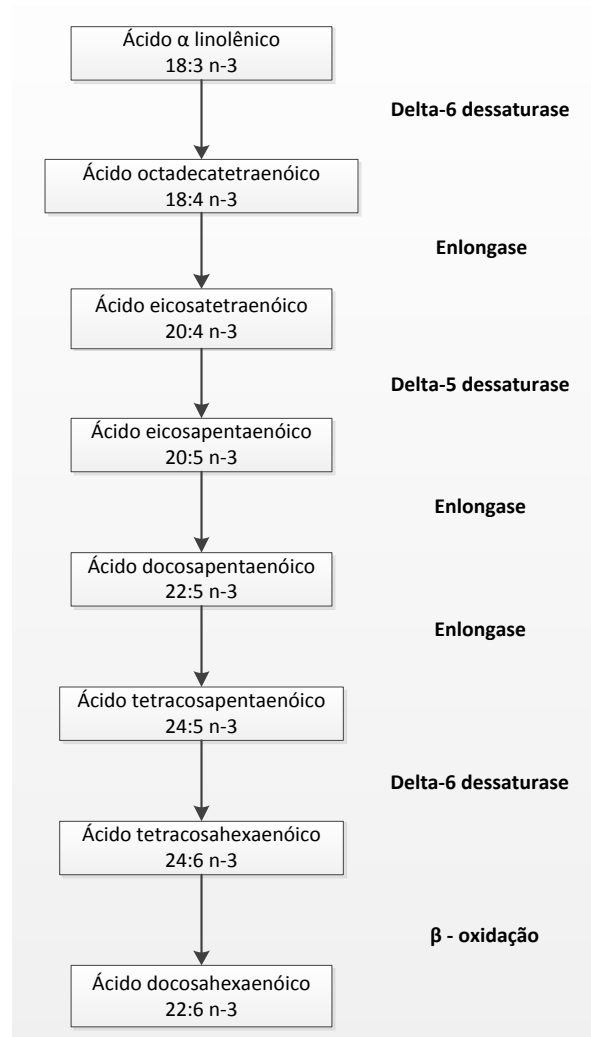


Figura 5. Elongação e dessaturação do ácido α -linolênico para a formação do ácido docosahexaenóico. Adaptado de Nakamura & Nara (2003) e Simopoulos (2011)

A presença de seis duplas ligações no DHA confere a essa molécula uma alta versatilidade quanto à sua conformação espacial. Normalmente, os PUFAs são representados em uma disposição em forma de “U”, quando comparado ao ácido graxo saturado, apresenta uma área tridimensional maior, porém, quando comparado a um ácido graxo mono-insaturado, essa área torna-se menor devido à disposição em “L” deste último. No entanto, os PUFAs e, em especial o DHA, não possuem uma forma fixa, e essa característica conformacional flexível favorece a fluidez da MP (Figura 6). Algumas configurações, como a helicoidal, possuem como característica baixa energia e maior estabilidade, porém a transição entre as conformações ocorre em intervalos de picosegundos ou nanosegundos (Garwrisch et al., 2003).

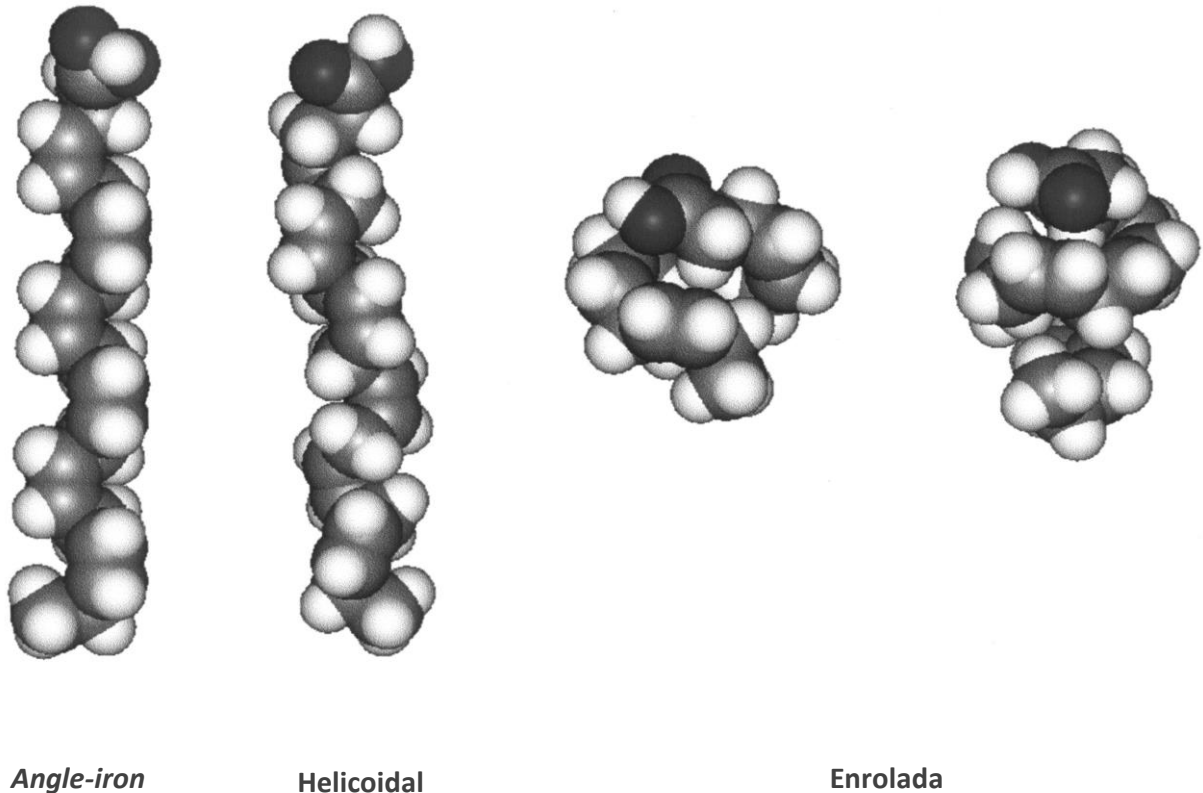


Figura 6. Ácido docosahexaenoico em diferentes conformações espaciais. Fonte: Garwisch et al. (2003)

Quando incorporado na MP, o DHA possui afinidade por proteínas estruturais, podendo formar domínios ricos em DHA em torno dessas proteínas, em contrapartida, tem pouca afinidade pelo colesterol. Dessa forma, a suplementação com DHA pode modificar a composição lipoproteica da MP, além de influenciar na temperatura da transição de fase, permeabilidade, fusão entre membranas e inversão dos fosfolípidos entre os folhetos da MP (*flip-flop*). Esse ácido graxo é inicialmente incorporado na fosfatidiletanolamina (PE) enquanto que nas outras classes de FFL a incorporação é em menor quantidade, acumulando-se, preferencialmente, no folheto interno da bicamada (Stillwell e Wassal, 2003).

O DHA foi encontrado em altas concentrações nos espermatozoides de bovinos (Neil e Masters, 1972) e, em primatas, foi relatado que a cauda contém 99% do DHA presente no espermatozoide e que a maior quantidade de PUFAs nesta região está provavelmente relacionada com a necessidade de maior fluidez e flexibilidade, devido ao movimento flagelar (Connor et al., 1998).

Em seres humanos o DHA vem sendo estudado no tratamento de diversos tipos de câncer (Hull, 2011), doença de Alzheimer (Grimm et al., 2013), problemas cardiovasculares (Yagi et al., 2014) e seus efeitos no sistema nervoso, visto que é um tecido que também possui elevadas concentrações desse PUFA (El-Ansary e Al-Ayadhi, 2014). Além dos benefícios encontrados nessas patologias, a suplementação com DHA aumenta a qualidade seminal em humanos (Safarinejad et al., 2010), suínos (Mitre et al., 2004), equinos (Harris et al., 2005), camundongos (Roqueta-Rivera et al., 2010) e bovinos (Gholami et al., 2010).

A adição *in vitro* de óleo de peixe, rico em DHA, ao diluidor de congelação de sêmen suíno, resultou em valores superiores das variáveis motilidade e integridade das membranas plasmática e acrossomais, após a descongelação (Kaeoket et al., 2010). Os autores concluíram que a incorporação do DHA na MP do espermatozoide aumentou a fluidez, e essa característica torna o espermatozoide mais tolerante à criopreservação.

Nasiri et al. (2012) e Towhidi e Parks (2012) testaram a adição de DHA isoladamente ou em conjunto com vitamina E ao diluidor de congelação de sêmen bovino e, em ambos os trabalhos, foi relatada a incorporação deste AG na MP do espermatozoide após o período de incubação de 30 minutos a 37°C e melhora da qualidade seminal pós-descongelação no caso da associação desses compostos. Os valores superiores de motilidade e integridade da MP podem ter sido devidos à incorporação do DHA, aumentando a flexibilidade da MP e protegendo dos efeitos deletérios da congelação (Nasiri et al., 2012). A associação de um PUFA com um antioxidante se mostra importante devido à susceptibilidade ao ataque das ROS nas duplas ligações do DHA (Towhidi e Parks, 2012).

2.12 Considerações Finais

Com base no exposto, observa-se que a maior fluidez da membrana plasmática do espermatozoide beneficia as características do sêmen submetido à preservação, porém, pode tornar essa célula mais susceptível ao estresse oxidativo. A produção excessiva de ROS pode resultar em danos irreversíveis à membrana plasmática e fragmentação do DNA, comprometendo o sucesso da refrigeração do sêmen equino. Apesar de o sêmen refrigerado ser amplamente comercializado, ainda existem alguns animais que não apresentam bons resultados com essa

biotécnica. A adição de ácidos graxos poli-insaturados e antioxidantes ao diluidor de sêmen está entre as linhas de pesquisa que buscam aumentar a longevidade do sêmen refrigerado, no entanto, os resultados obtidos até o momento demonstram que ainda são necessários mais estudos buscando diferentes antioxidantes e/ou a associação de mais de uma substância com o intuito de proteger contra o choque térmico pelo frio e o estresse oxidativo, favorecendo, assim, a viabilidade da célula espermática por períodos mais prolongados.

3 REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; SALEH, R.A.; BEDAIWY, M.A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and Sterility**, v.79, p.829-43, 2003

AGARWAL, A.; VIRK, G.; ONG, C.; PLESSIS, S.S. Effect of oxidative stress on male reproduction. **World Journal of Men's Health**, v.32, p.1-17, 2014.

AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v.7, p.659-668, 1995.

AITKEN, R.J.; SMITH, T.B.; JOBLING, M.S.; BAKER, M.A.; DE IULIIS, G.N. Oxidative stress and male reproductive health. **Asian Journal of Andrology**, v.13, p.31-38, 2014.

ALMEIDA, J.; BALL, B.A. Effect of α -tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.87, p.321-337, 2005.

ALVARENGA, M.A. Problems and solutions in equine embryo transfer programs in Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, suppl.1, v.38, p.319-333, 2010.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: McKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**. 2. ed. West Sussex: Wiley-Blackwell, cap.98, v.1, p.1053-1084, 2011.

ARATA, T.; OKITSU, T.; FUKAZAWA, T.; IKEDA, H.; KOBAYASHI, K.; YONG, C.; KOSAKA, Y.; NARUSHIMA, M.; MATSUOKA, J.; YAMAMOTO, I.; TANAKA, N.; LAKEY, J.R.T.; KOBAYASHI, N. Maintenance of glucose-sensitive insulin secretion of cryopreserved human islets with university of Wisconsin solution and ascorbic acid-2 glucoside. **Artificial Organs**, v.28, p.529-536, 2004.

ARNHOLD, J.; OSIPOV, A.N.; SPALTEHOLZ, H.; PANASENKO, O.M.; SCHILLER, J. Effects of hypochlorous acid on unsaturated phosphatidylcholines. **Free Radical Biology and Medicine**, v.31, p.1111-1119, 2001.

ARNHOLD, J.; OSIPOV, A.N.; SPALTEHOLZ, H.; PANASENKO, O.M.; SCHILLER, J. Formation of lysophospholipids from unsaturated phosphatidylcholines under the influence of hypochlorous acid. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1572, p.91-100, 2002.

AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.65-75, 2005.

AURICH, J.E.; SCHÖNHERR, L.U.; HOPPE, T.H.; AURICH, C. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. **Theriogenology**, v.48, p.185-192, 1997.

BALL, B.A.. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. **Animal Reproduction Science**, v.107, p. 257-267, 2008.

BALL, B.A., VO, A. Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C- 11-BODIPY581/591. **Journal of Andrology**, v.23, p.259-269, 2002.

BALL, B.A.; MEDINA, V.; GRAVANCE, C.G.; BAUMBER, J. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. **Theriogenology**, v.56, p.577-589, 2001.

BARRIER-BATTUT, I.; BONNET, C.; GIRAUDO, A.; DUBOIS, C.; CAILLAUD, M.; VIDAMENT, M. Removal of seminal plasma enhances membrane stability on fresh and cooled stallion spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v.48, p.64-71, 2013.

BATELLIER, F.; VIDAMENT, M.; FAUQUANT, J.; DUCHAMP, G.; ARNAUD, G.; YVON, J.M.; MAGISTRINI, M. Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.181-190, 2001.

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; MEDINA, V.; DAVIES-MOREL, M.C.G. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. **Journal of Andrology**, v.21, p.895-902, 2000.

BAUMBER, J.; SABEUR, K.; VO, A.; BALL, B.A. Reactive oxygen species promote tyrosine phosphorylation and capacitation in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.60, p.1239-1247, 2003.

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFAR, J.J. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. **American Journal of Veterinary Research**, v.66, n.5, p.772-779, 2005.

- BETTERIDGE, J. What is oxidative stress? **Metabolism**, Suppl.1, v.49, p.3-8, 2000.
- BIELSKI, B.H.J.; ARUDI, R.L.; SUTHERLAND, M.W. A study of the reactivity of perhydroxyl radical/superoxide ion with unsaturated fatty acids. **Journal of Biological Chemistry**, v.258, p.4759-4761, 1983.
- BOWRY, V.W.; MOHR, D.; CLEARY, J.; STOCKER, R. Prevention of tocopherol-mediated peroxidation in ubiquinol-10-free human low density lipoprotein. **Journal of Biological Chemistry**, v.270, p.5756-5763, 1995.
- BRANDON, C.I.; HEUSNES, G.L.; CAUDLE, A.B.; FAYRER-HOSKEN, R.A. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their correlation with fertility. **Theriogenology**, v.52, p.863-873, 1999.
- BRINSKO, S.P.; CROCKETT, E.C.; SQUIRES, E.L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoa motility after cooling and storage. **Theriogenology**, v.54, p.129-136, 2000.
- BRINSKO, S.C.; VARNER, D.D.; LOVE, C.C.; BLANCHARD, T.L.; DAY, B.C.; WILSON, M.E. Effect of feeding a DHA-enriched nutraceutical on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen. **Theriogenology**, v.63, p.1519-1527, 2005.
- BUCCI, B.; RODRIGUEZ-GIL, J.E.; VALLORANI, C.; SPINACI, M.; GALEATI, G.; TAMANINI, C. GLUTs and mammalian sperm metabolism. **Journal of Andrology**, v.32, p.348-355, 2011.
- BURNAUGH, L., SABEUR, K., BALL, B.A. Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium. **Theriogenology**, v.67, p.580-589, 2007
- BÜTÜN, A.; NAZIROĞLU, M.; DEMIRCI, S.; CELIK, O.; UĞUZ, A.C. Riboflavin and vitamin E increase brain calcium and antioxidants, and microsomal calcium-ATP-ase values in rat headache models induced by glyceryl trinitrate. **Journal of Membrane Biology**, DOI 10.1007/s00232-014-9758-5, 2014.
- CHAPMAN, D.; WILLIAMS, R.M.; LADBROOKE, B.D. Physical studies of phospholipids. VI. Thermotropic and lyotropic mesomorphism of some 1,2-diacylphosphatidylcholines (lecithins). **Chemistry and Physics of Lipids**, v.1, p.445-475, 1967.
- CHOW, C.K. Distribution of tocopherols in human plasma and red blood cells. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.28, p.756-760, 1975.
- CHUNMEI, X.; WEI, X.; SHENG, Y.; LEI, A.; XIHE, L.; ZHONGHONG, W.; JIAXING, Z.; ZHUQING, W.; JIANHUI, T. Effect of antioxidant supplementation on function and fertility of sex-sorted boar spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.136, p.108-114, 2012.

COCCHIA, N.; PASOLINI, M.P.; MANCINI, R.; PETRAZZUOLO, O.; CRISTOFARO, I.; ROSAPANE, I.; SICA, A.; TORTORA, G.; LORIZIO, R.; PARAGGIO, G.; MANCINI, A. Effect of SOD (superoxide dismutase) protein supplementation in semen extenders on motility, viability, acrosome status and ERK (extracellular signal-regulated kinase) protein phosphorylation of chilled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.75, p.1201-1210, 2011.

CONNOR, W.E.; LIN, D.S.; WOLF, D.P.; ALEXANDER, M. Uneven distribution of desmosterol and docosahexaenoic acid in the heads and tails of monkey sperm. **Journal of Lipids Research**, v.39, p.1404-1411, 1998.

CONTRI, A.; AMICIS, I.; MOLINARI, A.; FAUSTINI, M.; GRAMENZI, A.; ROBBE, D.; CARLUCCIO, A. Effect of dietary antioxidant supplementation on fresh semen quality in stallion. **Theriogenology**, v.75, p.1319-1326, 2011.

DARNELL, J.; LODISH, H.; BALTIMORE, D. The plasma membrane. In:____. **Molecular Cell Biology**. 2. ed. New York: Scientific American Books, 1990. cap.13, p.491-530.

DOUGLAS-HAMILTON, D.H.; OSOL, R.; OSOL, G.; DRISCOLL, D.; NOBLE, H. A field study of fertility of transported equine semen. **Theriogenology**, v.22, p.291-304, 1984.

DRESSER, G.K.; WACHER, V.; WONG, S.; WONG, H.T.; BAILEY, D.G. Evaluation of peppermint oil and ascorbyl palmitate as inhibitors of cytochrome P4503A4 activity in vivo and in vitro. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, v.72, p.247-255, 2002.

DURU, N.K.; MORSHEDI, M.; OEHNINGER, S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v.74, p.1200-1207, 2000.

EL-ANSARY, A.; AL-AYADHI, L. Relative abundance of short chain and polyunsaturated fatty acids in propionic acid-induced autistic features in rat pups as potential markers in autism. **Lipids in Health and Disease**, v.13, p. 1-10, 2014.

ELZANATY, S.; RICHTHOFF, J.; MALM, J.; GIWERCMAN, A. The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. **Human Reproduction**, v.17, p.2904-2911, 2002.

EKHLASI-HUNDRIESER, M.; SCHAFER, B.; KIRCHHOFF, C.; HESS, O.; BELLAIR, S.; MÜLLER, P.; TÖPFER-PETERSEN, E. Structural and molecular characterization of equine sperm-binding fibronectin-II module proteins. **Molecular Reproduction and Development**, v.70, p.45-57, 2005.

FARRÁS, M.C.; AVANZI, B.R.; MELO, C.M.; DELL'AQUA, J.A.; PAPA, F.O. Efeito de diferentes diluentes na manutenção das características do sêmen equino em dois sistemas de refrigeração passiva. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, p.693-699, 2008.

FARRÁS, M.C.; FIORATTI, E.G.; NETO, C.R.; CARMO, M.T.; OLIVEIRA, R.A.; PAPA, F.O.; PUOLI FILHO, J.N.P.; ALVARENGA, M.A. Comparação de diferentes temperaturas de armazenamento de sêmen refrigerado de garanhões da raça Mangalarga Marchador e Quarto de Milha. **Veterinária e Zootecnia**, v.21, p.187-195, 2014.

FERRAMOSCA, A.; ZARA, V. Bioenergetics of mammalian sperm capacitation. **Biomed Research International**, v.2014, p.1-8, 2014.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, p.61-68, 1997.

FLESCHE, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1469, p.197-235, 2000.

FRANCO, J.S.V.; CHAVEIRO, A.; GÓIS, A.; SILVA, F.M. Effects of α -tocopherol and ascorbic acid on equine semen quality after cryopreservation. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.33, p.787-793, 2013.

FRAZER, G.S.; BUCCI, D.M. SDS-PAGE characterization of the proteins in equine seminal plasma. **Theriogenology**, v.46, p.579-591, 1996.

FREI, B.; LAWSON, S. Vitamin C and cancer revisited. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.105, p.11037-11038, 2008.

GAWRISCH, K.; ELDHO, N.V.; HOLTE, L.L. The structure of DHA in phospholipid membranes. **Lipids**, v.38, p.445-452, 2003.

GHOLAMI, H.; CHAMANI, M.; TOWHIDI, A.; FAZELI, M.H. Effect of feeding a docosahexaenoic acid-enriched nutraceutical on the quality of fresh and frozen-thawed semen in Holstein bulls. **Theriogenology**, v.74, p.1548-1558, 2010.

GIBB, Z.; LAMBOURNE, S.R.; AITKEN, R.J. The paradoxical relationship between stallion fertility and oxidative stress. **Biology of Reproduction**, v.91, p.1-10, 2014.

GONZÁLEZ-MARÍN, C.; GOSÁLVEZ, J.; ROY, R. Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. **International Journal of Molecular Science**, v.13, p.14026-14052, 2012.

GRAHAM, J.K. Principles of cooled semen. In: McKINNON, A.O., SQUIRES, E.L., VAALA, W.E., VARNER, D.D. **Equine Reproduction**. 2. ed. West Sussex: Wiley-Blackwell, cap.127, v.1, p.1308-1315, 2011.

GRAHAM, J.K.; FOOTE, R.H. Effect of several lipids, fatty acyl chain length and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. **Cryobiology**, v.24, p.42–52, 1987.

GREEN, K.; BRAND, M.D.; MURPHY, M.P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, suppl.1, v.53, p.110-118, 2004.

GRIMM, M.O.W.; ZIMMER, V.C.; LEHMANN, J.; GRIMM, H.S.; HARTMANN, T. The impact of cholesterol, DHA, and sphingolipids on Alzheimer's disease. **Biomed Research International**, v.2013, p.1-16, 2013.

HABER, V.F.; WEISS, J. Über die Katalyse des Hydroperoxydes. **Naturwissenschaften**, v.20, p.948–950, 1932.

HAMMERSTEDT, R.H.; VOLONTE, C.; RACKER, E. Motility, heat, and lactate production in ejaculated bovine sperm. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.266, p.111-123, 1988.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v.11, p.73-88, 1990.

HAN, R.; LIU, L.; LI, J.; DU, G.; CHEN, J. Functions, applications and production of 2-O-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.95, p.313-320, 2012.

HARRIS, M.A.; BAUMGARD, L.H.; ARNS, M.J.; WEBEL, S.K. Stallion spermatozoa membrane phospholipid dynamics following dietary n-3 supplementation. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.234-237, 2005.

HARTWIG, F.P.; LISBOA, F.P.; HARTWIG, F.P.; MONTEIRO, G.A.; MAZIERO, R.R.D.; FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; DELL'AQUA JR, J.A. Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: An alternative for bad cooler stallions. **Theriogenology**, v.81, p.340-346, 2014.

HOWARD, A.C.; McNEIL, A.K.; McNEIL, P.L. Promotion of plasma membrane repair by vitamin E. **Nature Communications**, v.20, p.1-8, 2011.

HUANG, W.Y.; LEE, P.C.; HUANG, L.K.; LU, L.P.; LIAO, W.C. Stability studies of ascorbic acid 2-glucoside in cosmetic lotion using surface response methodology. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.23, p.1583-1587, 2013.

HULL, M.A. Omega-3 polyunsaturated fatty acids. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v.25, p.547-554, 2011.

JASKO, D.J.; HATHAWAY, J.A.; SCHALTENBRAND, V.L.; SIMPER, W.D.; SQUIRES, E.L. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.37, p.1241-1252, 1992.

JENKINS, T.G.; KENNETH, B.S.; ASTON, I.; CARRELL, D.T. Supplementation of cryomedium with ascorbic acid-2-glucoside (AA2G) improves human sperm post-thaw motility. **Fertility and Sterility**, v.95, p.2001-2004, 2011.

JIALAL, I.; VEGA, G.L.; GRUNDY, S.M. Physiologic levels of ascorbate inhibit the oxidative modification of low density lipoprotein. **Atherosclerosis**, v.82, p.185-191, 1990.

JOBIM, M.I.M.; BUSTAMANTE FILHO, I.C.; TREIN, C.; WALD, V.B.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Equine seminal plasma proteins related with fertility. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.199-321, 2005.

JOBIM, M.I.M.; TREIN, C.; ZIRKLER, H.; GREGORY, R.M.; SIEME, H.; MATTOS, R.C. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**, v.76, p.765-771, 2011.

KAEOKET, K.; SANG-URAI, P.; THAMNIYOM, A.; CHANAPIWAT, P.; TECHAKUMPHU, M. Effect of docosahexaenoic acid on quality of cryopreserved boar semen in different breeds. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.458-463, 2010.

KAYSER, J.P.; AMANN, R.P.; SHIDELER, R.K.; SQUIRES, E.L.; JASKO, D.J.; PICKETT, B.W. Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.38, p.601-614, 1992.

KAMISAH, Y.; QODRIYAH, H.M.; CHUA, K.H.; NUR AZLINA, M.F. Vitamin E: A potential therapy for gastric mucosal injury. **Pharmaceutical Biology**, v.52, p.1591-1597, 2014.

KANKOFER, M.; KOLM, G.; AURICH, J.E.; AURICH, C. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5 °C. **Theriogenology**, v.63, p.1354-1365, 2005.

KIRK, E.S.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L. Increasing membrane cholesterol content benefits the motility of cooled equine semen. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.317-318, 2001.

KOBORI, Y.; OTA, S.; SATO, R.; YAGI, H.; SOH, S.; ARAI, G.; OKADA, H. Antioxidant cosupplementation therapy with vitamin C, vitamin E, and coenzyme Q10 in patients with oligoasthenozoospermia. **Archivio Italiano di Urologia e Andrologia**, v.86, p.1-4, 2014.

KOPPERS, A.J.; MITCHELL, L.A.; WANG, P.; LIN, M.; AITKEN, R.J. Phosphoinositide 3-kinase signalling pathway involvement in a truncated apoptotic cascade associated with motility loss and oxidative DNA damage in human spermatozoa. **Biochemical Journal**, v.436, p.687-697, 2011.

KUMANO, Y.; SAKAMOTO, T.; EGAWA, M.; IWAI, I.; TANAKA, M.; YAMAMOTO, I. In vitro and in vivo prolonged biological activities of novel vitamin C derivative, 2-O-alpha-D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid (AA-2G), in cosmetic fields. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v.44, p.345-359, 1998.

LEBIQ, J.; GEY, C.; SCHILLER, J.; SÜß, R.; PAASCH, U.; GRUNEWALD, S.; GLANDER, H.J.; ARNHOLD, J. Hypochlorous acid-induced stress on human spermatozoa. A model for inflammation in the male genital tract. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.135, p.201-211, 2005.

LINFOR, J.J.; MEYERS, S.A. Detection of DNA damage in response to cooling injury in equine spermatozoa using single-cell gel electrophoresis. **Journal of Andrology**, v.23, p.107-113, 2002.

LU, P.W.; LILLARD, D.W.; SEIB, P.A.; KRAMER, K.J.; LIANG, Y.T. Synthesis of the 2-methyl ether of L-ascorbic acid: stability, vitamin activity, and carbon-13 nuclear magnetic resonance spectrum compared to those of the 1- and 3-methyl ethers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.32, p.21-28, 1984.

MAXWELL, W.M.; STOJANOV, T. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. **Reproduction and Fertility Development**, v.8, p.1013-1020, 1996.

MARTIN, O.C.; PAGANO, R.E. Transbilayer movement of fluorescent analogs of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine at the plasma membrane of cultured cells. **Journal of Biological Chemistry**, v.262, p.5890-5898, 1987.

McINTOSH, T.J. Structure and physical properties of the lipid membrane. In:____ **Current Topics in Membranes**. v.48, Academic Press, 1999, cap.2, p.23-47.

MEMON, A.A.; WAHID, H.; ROSNINA, Y.; GOH, Y.M.; EBRAHIMI, M.; NADIA, F.M. Effect of antioxidants on post thaw microscopic, oxidative stress parameter and fertility of Boer goat spermatozoa in Tris egg yolk glycerol extender. **Animal Reproduction Science**, v.136, p.55-60, 2012.

MITRE, R.; CHEMINADE, C.; ALLAUME, P.; LEGRAND, P.; LEGRAND, A.B. Oral intake of shark liver oil modifies lipid composition and improves motility and velocity of boar sperm. **Theriogenology**, v.62, p.1557-1566, 2004.

MOCÉ, E.; BLANCH, E.; TOMÁS, C.; GRAHAM, J.K. Use of cholesterol in sperm cryopreservation: present moment and perspectives to future. **Reproduction in Domestic Animals**, suppl. 2, v.45, p.57-66, 2010.

MORAN, D.M.; JASKO, D.J.; SQUIRES, E.L.; AMANN, R.P. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.38, p.999-1012, 1992.

MURPHY, C.; ENGLISH, A.M.; HOLDEN, S.A.; FAIR, S. Cholesterol-loaded-cyclodextrins improve the post-thaw quality of stallion sperm. **Animal Reproduction Science**, v.145, p.123-129, 2014.

NADJARZADEH, A.; MEHRSAI, A.; MOSTAFAVI, E.; GOHARI, M.R.; SHIDFAR, F. The association between dietary antioxidant intake and semen quality in infertile men. **Medical Journal of the Islamic Republic of Iran**, v.27, p.204-209, 2013.

NAKAMURA, M.T.; NARA, T.Y. Essential fatty acid synthesis and its regulation in mammals. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.68, p.145-150, 2003.

NASIRI, A.H.; TOWHIDI, A.; ZEINOALDINI, S. Combined effect of DHA and α -tocopherol supplementation during bull semen cryopreservation on sperm characteristics and fatty acid composition. **Andrologia**, v.44, p.550-555, 2012.

NEILL, A.R.; MASTERS, C.J. Metabolism of fatty acids by bovine spermatozoa. **Biochemical Journal**, v.127, p.375-385, 1972.

NIKI, E.; TRABER, M.G. A history of vitamin E. **Annals of Nutrition & Metabolism**, v.61, p.207-212, 2012.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v.31, p.1287-1312, 2001.

NUNES, D.B.; ZORZATTO, J.R.; COSTA E SILVA, E.V.; ZÚCCARI, C.E.S.N. Efficiency of short-term storage of equine semen in a simple-design cooling system. **Animal Reproduction Science**, v.104, p.434-439, 2008.

OKUBO, K.; NAKANISHI, H.; MATSUNAMI, M.; SHIBAYAMA, H.; KAWABATA, A. Topical application of disodium isostearyl 2-O-L-ascorbyl phosphate, an amphiphilic ascorbic acid derivative, reduces neuropathic hyperalgesia in rats. **British Journal of Pharmacology**, v.166, p.1058-1068, 2012.

PACKER, J.E.; SLATER, T.F.; WILLSON, R.L. Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. **Nature**, v.278, p.737-738, 1979.

PAPA, F.O.; MELO, C.M.; DELL'AQUA, J.A.; MACEDO, L.P.; CARVALHO, A.G.; ALVARENGA, M.A.; MEDEIROS, A.S.L. Methodological innovations in the biotechnology cooled and freezing of equine semen. **Acta Scientiae Veterinariae**, suppl.1, v.33, p.19-27, 2005.

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

PEÑA, F.J.; RODRÍGUEZ MARTÍNEZ, H.; TAPIA, J.A.; ORTEGA FERRUSOLA, C.; GONZALEZ FERNANDEZ, L.G.; MACÍAS GARCÍA, B. Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: A review. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44, p.345-349, 2009.

PESCH, S.; BERGMANN, M.; BOSTEDT, H. Determination of some enzymes and macro- and microelements in stallion seminal plasma and their correlations to semen quality. **Theriogenology**, v.66, p.307-313, 2006.

PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. Extension and storage of stallion spermatozoa: a review. **Journal of Equine Veterinary Journal**, v.7, p.289-301, 1987.

PIKE, J.L. Rafts defined: a report on the keystone symposium on lipid rafts and cell function. **Journal of Lipid Research**, v.47, p.1597-1598, 2006.

QUINN, P.J. Principles of membrane stability and phase behavior under extreme conditions. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v.21, p.3-19, 1989.

RIZVI, S.; RAZA, S.T.; AHMED, F.; AHMAD, A.; ABBAS, S.; MAHDI, F. The role of vitamin E in human health and some diseases. **Sultan Qaboos University Medical Journal**, v.14, p.157-165, 2014.

ROQUETA-RIVERA, M.; STROUD, C.K.; HASCHEK, W.M.; AKARE, S.J.; SEGRE, M.; BRUSH, R.S.; AGBAGA, M.P.; ANDERSON, R.E.; HESS, R.A.; NAKAMURA, M.T. Docosahexaenoic acid supplementation fully restores fertility and spermatogenesis in male delta-6 desaturase-null mice. **Journal of Lipid Research**, v.51, p.360-367, 2010.

RUMSEY, S.C.; LEVINE, M. Absorption, transport, and disposition of ascorbic acid in humans. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.9, p.116-130, 1998.

SABEUR, K.; BALL, B.A. Characterization of NADPH oxidase 5 in equine testis and spermatozoa. **Reproduction**, v.134, p.263-270, 2007.

SAFARINEJAD, M.R.; HOSSEINI, S.Y.; DADKHAH, F.; ASGARI, M.A. Relationship of omega-3 and omega-6 fatty acids with semen characteristics, and anti-oxidant status of seminal plasma: A comparison between fertile and infertile men. **Clinical Nutrition**, v.29, p.100-105, 2010.

SANOCKA, D.; KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.2, n.12, p.1-7, 2004.

SCHULTE, R.T.; OHL, D.A.; SIGMAN, M.; SMITH, G.D. Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays, and outcomes. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.27, p.3-12, 2010.

SHORE, M.D.; MACPHERSON, M.L.; COMBES, G.B.; VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L. Fertility comparison between breeding at 24 hours or at 24 and 48 hours after collection with cooled equine semen. **Theriogenology**, v.50, p.693-698, 1998.

SILVA, P.F.N. Physiology of peroxidation processes in mammalian sperm. Utrecht. 2006. 178p. Tese (Doutorado) – Faculty of Veterinarian Medicine – Utrecht University.

SIMOPOULOS, A.P. Evolutionary aspects of diet: the omega-6/omega-3 ratio and the brain. **Molecular Neurobiology**, v.44, p.203-215, 2011.

SINGER, S.J.; NICOLSON, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v.175, p.720–31, 1972.

SMITH, T.B.; DUN, M.D.; SMITH, N.D.; CURRY, B.J.; CONNAUGHTON, H.S.; AITKEN, R.J. The presence of a truncated base excision repair pathway in human spermatozoa that is mediated by OGG1. **Journal of Cell Science**, v.126, p.1488-1497, 2013.

SOUZA, J.D.S.; FERREIRA, W.M. O papel da vitamina E na nutrição e reprodução animal - meios de defesa contra os radicais livres. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.4, p.456-461, 2007.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K.; VANDERWALL, D.K.; McCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E. Cooled and Frozen Stallion Semen. **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory**. Fort Collins, Bulletin n. 9, p.1-38, 1999.

STEPANYAN, V.; CROWE, M.; HALEAGRAHARA, N.; BOWDEN, B. Effects of vitamin E supplementation on exercise-induced oxidative stress: a meta-analysis. **Applied Physiology, Nutrition and Metabolism**, v.39, p.1029-1037, 2014.

STILLWELL, W.; WASSALL, S.R. Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.126, p.1-27, 2003.

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

TAI, A.; FUJINAMI, Y.; MATSUMOTO, K.; KAWASAKI, D.; YAMAMOTO, I. Bioavailability of a series of novel acylated ascorbic acids derivatives, 6-O-acyl-2-O- α -D-glucopiranosyl-L-ascorbic acid, as an ascorbic acid supplement in rat and guinea pigs. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.66, p.1628-1634, 2002.

TAKAHASHI, T.; ITOH, R.; NISHINOMIYA, H.; KATOH, M.; MANABE, N. Effect of linoleic acid albumin in a dilution solution and long-term equilibration for freezing of bovine spermatozoa with poor freezability. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.92-97, 2012.

TAKEBAYASHI, J.; TAI, A.; YAMAMOTO, I. pH-dependent long-term radical scavenging activity of AA-2G and 6-Octa-AA-2G against 2,29-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.26, p.1368-1370, 2003.

TAKEBAYASHI, J.; TAI, A.; GOHDA, E.; YAMAMOTO, I. Characterization of the Radical-scavenging reaction of 2-O-Substituted ascorbic acid derivatives, AA-2G, AA-2P, and AA-2S: A kinetic and stoichiometric study. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.29, p.766-771, 2006.

TAKEBAYASHI, J.; ASANO, R.; NAKAE, Y.; SAITO, M.; GOHDA, E.; YAMAMOTO, I.; TAI, A. 2-O- α -D-Glucopyranosil-L-ascorbic acids scavenges 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil radicals via covalent adduct formation. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.71, p.754-760, 2007a.

TAKEBAYASHI, J.; KAJI, H.; ICHIYAMA, K.; MAKINO, K.; GOHDA, E.; YAMAMOTO, I.; TAI, A. Inhibition of free radical-induced erythrocyte hemolysis by 2-O-substituted ascorbic acid derivatives. **Free Radical Biology & Medicine**, v.43, p.1156-1164, 2007b.

TAKESUE, M.; MARUYAMA, M.; SHIBATA, N.; KUNIEDA, T.; OKITSU, T.; SAKAGUCHI, M.; TOTSUGAWA, T.; KOSAKA, Y.; ARATA, A.; IKEDA, H.; MATSUOKA, J.; OYAMA, T.; KODAMA, M.; OHMOTO, K.; YAMAMOTO, S.; KURABAYASHI, Y.; YAMAMOTO, I.; TANAKA, N.; KOBAYASHI, N. Maintenance of cold-preserved porcine hepatocyte function with UW solution and ascorbic acid-2 glucoside. **Cell Transplantation**, v.12, p.599-606, 2003.

TATEMOTO, H.; OOTAKI, K.; SHIGETA, K.; MUTO, N. Enhancement of developmental competence after in vitro fertilization of porcine oocytes by treatment with ascorbic acid 2-O- α -glucoside during in vitro maturation. **Biology of Reproduction**, v.65, p.1800-1806, 2001.

TOWHIDI, A.; PARKS, J.E. Effect of n-3 fatty acids and α -tocopherol on post-thaw parameters and fatty acid composition of bovine sperm. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.29, p.1051-1056, 2012.

TRAN, K.; WONG, J.T.; LEE, E.; CHAN, A.C.; CHOY, P.C. Vitamin E potentiates arachidonate release and phospholipase A2 activity in rat heart myoblastic cells. **Biochemical Journal**, v.319, p.385-391, 1996.

TROEDSSON, M.H.T.; DESVOUSGES, A.; ALGHAMDI, A.S.; DAHMS, B.; DOW, C.A.; HAYNA, J.; VALESCO, R.; COLLAHAN, P.T.; MACPHERSON, M.L.; POZOR, M.; BUHI, W.C. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.171-86, 2005.

TURNER, R.M. Tales from the tail: what do we really know about sperm motility? **Journal of Andrology**, v.24, p.790-803, 2003.

VARNER, D.D.; JOHNSON, L. From a sperm's eye view: revisiting our perception of this intriguing cell. **American Associations of Equine Practitioners Proceedings**, v.53, p.104-117, 2007.

VARNER, D.D., BLANCHARD, T.L., LOVE, C.L., GARCIA, M.M, KENNEY, R.M. Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**, v.28, p.709-723, 1987.

VARNER, D.D., BLANCHARD, T.L., LOVE, C.L., GARCIA, M.C., KENNEY, R.M. Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**, v.29, p.1043-1053, 1988.

VARNER, D.D.; GIBB, Z.; AITKEN, R.J. Stallion fertility: a focus on the spermatozoon. **Equine Veterinary Journal**. doi: 10.1111/evj.12308, 2014.

VELASQUEZ-PEREIRA, J.; CHENOWETH, P.J.; McDOWELL, L.M.; RISCO, C.A.; STAPLES, C.A.; PRICHARD, D.; MARTIN, F.G.; CALHOUN, M.C.; WILLIAMS, S.N.; WILKINSON, N.S. Reproductive effects of feeding gossypol and vitamin E to bulls. **Journal of Animal Science**, v.76, p.2894-2904, 1998.

VOLPE, S.; LEOCI, R.; AIUDI, G.; LACALANDRA, G.M. Relationship between motility and mitochondrial functional status in canine spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, suppl.2, v.44, p. 275-278, 2009.

WASSALL, S.R.; STILLWELL, W. Polyunsaturated fatty acid-cholesterol interactions: domain formation in membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1788, p.24-32, 2009.

WAYNER, D.D.M.; BURTON, G.W.; INGOLD, K.U.; BARCLAY, L.R.C.; LOCKE, S.J. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.924, p.408-419, 1987.

WEISIGER, R.A.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: organelle specificity. **Journal of Biological Chemistry**, v.248, p.3582-3592, 1973.

YAGI, S.; AIHARA, K.; FUKUDA, D.; TAKASHIMA, A.; HARA, T.; HOTCHI, J.; ISE, T.; YAMAGUCHI, K.; TOBIUME, T.; IWASE, T.; YAMADA, H.; SOEKI, T.; WAKATSUKI, T.; SHIMABUKURO, M.; AKAIKE, M.; SATA, M. Effects of docosahexaenoic acid on the endothelial function in patients with coronary artery disease. **Journal of Atherosclerosis and Trombosis**, v.21, p.1-8, 2014.

YAMAMOTO, I.; MUTO, N.; NAGATA, E.; NAKAMURA, T.; SUZUKI, Y. Formation of a stable L-ascorbic acid α -glucoside by mammalian α -glucosidase-catalyzed transglucosylation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1035, p.48-50, 1990.

YAMAMOTO, I.; MUTO, M.; MURAKAMI, K.; AKIAMA, J.I. Collagen synthesis in human skin fibroblasts is stimulated by a stable form of ascorbate, 2-O- α -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid. **Journal of Nutrition**, v.122, p.871-877, 1992.

YANAGIMACHI, R.; USUI, N. Calcium dependence of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. **Experimental Cell Research**, v.89, p.161-174, 1974.

YOSHIMOTO, T.; NAKAMURA, S.; YAMAUCHI, S.; MUTO, N.; NAKADA, T.; ASHIZAWA K.; TATEMOTO, H. Improvement of the post-thaw qualities of Okinawan native pig spermatozoa frozen in an extender supplemented with ascorbic acid 2-O-a-glucoside. **Cryobiology**, v.57, p.30-36, 2008.

CAPÍTULO 2

Adição de vitamina C, ácido ascórbico 2-glicosídeo e α -tocoferol ao diluidor de refrigeração do sêmen equino

Breno Fernandes Barreto Sampaio¹, Carmem Estefânia Serra Neto Zúccari²

¹Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

²Profa. Dra. da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Resumo: O objetivo do presente experimento foi avaliar os efeitos da adição dos antioxidantes hidrossolúveis vitamina C (Vit C), ácido ascórbico 2-glicosídeo (AA2G) e do antioxidante lipossolúvel α -tocoferol (α -Toh) ao diluidor, isoladamente e em associação, sobre as variáveis seminais do espermatozoide equino submetido à refrigeração por 72 horas. Foram utilizados dois ejaculados de dez garanhões e avaliados quanto à motilidade, vigor, integridade da membrana plasmática, fragmentação da cromatina, atividade mitocondrial e peroxidação lipídica, de acordo com os seguintes tratamentos: C – controle; Vit C – 0,65 mg/ml de vitamina C; AA2G – 200 μ M de ácido ascórbico 2-glicosídeo; α -Toh – 2 μ M de α -tocoferol; Vit C/ α -Toh – 0,65 mg/ml de vitamina C associado a 2 μ M de α -tocoferol; AA2G/ α -Toh – 200 μ M de ácido ascórbico 2-glicosídeo associado a 2 μ M de α -tocoferol. Na análise da peroxidação lipídica o grupo controle apresentou $2.506,2 \pm 796,4$ ng de MDA x 10^8 espermatozoides, valor que foi significativamente superior aos grupos tratados com os antioxidantes. Os valores médios de motilidade e vigor no grupo AA2G foram, respectivamente, $68,4 \pm 18,1\%$ e $3,7 \pm 0,7$, significativamente superiores ao observado no grupo controle que apresentou $62,1 \pm 16,2\%$ e $3,4 \pm 0,7$. Foi possível concluir que os antioxidantes protegeram a célula espermática frente à peroxidação lipídica e que o AA2G pode ter uma dupla função, agindo como antioxidante e como substrato energético para o espermatozoide.

Palavras-chave: antioxidante, espermatozoide, garanhão, lipoperoxidação

INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) com sêmen refrigerado é amplamente utilizada na espécie equina e se mostra como uma das biotécnicas mais importantes na reprodução desses animais. O uso da IA diminui a difusão de doenças sexualmente transmissíveis e permite a troca de material genético entre criatórios. No entanto, o sêmen refrigerado a 5°C apresenta resultados de fertilidade satisfatórios quando utilizado no período de até 48 h após a colheita e o processamento (Aurich et al., 1997).

Buscando aumentar a longevidade do sêmen refrigerado, algumas estratégias vêm sendo utilizadas, como a modificação dos diluidores e a adição de antioxidantes ao sêmen com o intuito de manter a integridade das membranas plasmática e acrossomais, prevenir contra os efeitos deletérios do estresse oxidativo e preservar a motilidade espermática, no entanto, os resultados obtidos se mostram variáveis quanto a seus efeitos (Ball et al., 2001; Almeida e Ball, 2005).

A produção de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* - ROS) é uma consequência do metabolismo oxidativo e está fisiologicamente envolvida nos processos de hiperativação e capacitação espermática, bem como na reação do acrossomo e interação entre o espermatozoide e o ovócito (Burnaugh et al., 2007). Porém, quando a produção de ROS supera a capacidade de neutralização do sistema antioxidante e ultrapassa os limites fisiológicos, ocorre o estresse oxidativo (EO). Esse fenômeno pode resultar em diminuição da motilidade, lesões na membrana plasmática (MP) e fragmentação do DNA, e por consequência leva a queda da fertilidade (Agarwal et al., 2014; Aitken et al., 2014; Varner et al., 2014).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma molécula capaz de atravessar as membranas celulares, sendo a principal ROS relacionada com a diminuição da motilidade e fragmentação do DNA em equinos (Baumber et al., 2000). O radical hidroxila ($OH\cdot$) é uma ROS altamente reativa, sendo extremamente lesiva aos sistemas biológicos (Betteridge, 2000). É responsável por iniciar a reação em cadeia da peroxidação lipídica (LPO) que resulta na produção de hidroperóxidos lipídicos, diminuição da fluidez da MP, impedindo a expressão de receptores celulares (Sanocka e Kurpisz, 2004), podendo interferir no sucesso da fecundação.

O plasma seminal (PS) dos equinos é rico em antioxidantes (Ball et al., 2001), no entanto, a diluição do sêmen no processo de resfriamento pode diminuir o efeito protetor desse sistema de defesa. A vitamina C (ácido ascórbico - Vit C) e o α -

tocoferol (α -Toh) são encontradas no plasma seminal. A Vit C é uma molécula hidrossolúvel que atua neutralizando o ânion superóxido (O_2^-), OH^- e hidroperóxidos lipídicos, protegendo contra o início da LPO. Além disso, é capaz de regenerar a α -Toh, reduzindo o radical α -tocoferil em α -tocoferol. A α -Toh é um antioxidante lipossolúvel capaz de proteger contra os efeitos da LPO, neutralizando o OH^- e os hidroperóxidos lipídicos (Jialal et al., 1990).

A Vit C é uma molécula instável, que pode ser rapidamente oxidada, o que leva a perda da função antioxidante (Ferreira e Matsubara, 1997; Frei e Lawson, 2008). Uma forma mais estável da Vit C, chamada ácido ascórbico 2-glicosídeo (AA2G), foi testada no sêmen de suínos e humanos submetidos à congelação e resultou em aumento significativo nas variáveis motilidade e integridade de membrana após a descongelação (Yoshimoto et al., 2008; Jenkins et al., 2011).

Ainda existem poucos relatos na literatura sobre os efeitos do AA2G no espermatozoide de mamíferos e, aparentemente, ainda não existem relatos sobre a ação do AA2G no sêmen equino. O objetivo do presente experimento foi avaliar os efeitos da adição ao diluidor dos antioxidantes hidrossolúveis Vit C, AA2G e do antioxidante lipossolúvel α -Toh, isoladamente e em associação, sobre as variáveis do sêmen equino submetido à refrigeração por 72 horas.

MATERIAL E MÉTODOS

Colheita e Transporte do Sêmen

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul ($20^\circ 26' 34'' S$; $54^\circ 38' 47'' W$), durante o período de estação de monta.

Foram utilizados dois ejaculados de dez garanhões adultos de fertilidade comprovada, com idades entre 6 e 17 anos. Somente ejaculados que apresentaram motilidade $\geq 70\%$ e vigor ≥ 3 após a colheita foram submetidos à refrigeração.

Para a colheita de sêmen foi utilizada a vagina artificial modelo Botucatu (Botupharma[®], Botucatu, São Paulo, Brasil), mantida a uma temperatura entre 42 e 45°C e as colheitas foram realizadas com auxílio de manequim ou de uma fêmea em estro.

Após a colheita do sêmen e avaliação das características seminais, uma alíquota contendo $1,4 \times 10^9$ espermatozoides foi diluída em meio de centrifugação a base de leite desnatado (Equimix[®], Nutricell, Campinas, São Paulo, Brasil) a uma concentração de 50×10^6 espermatozoides/mL. O transporte até o laboratório foi feito em contêiner a 15°C (Max-Sêmen[®]; EHG Agrofarma, Mogi-Mirim, São Paulo, Brasil) em intervalo máximo de 1 hora após a colheita.

Processamento do Sêmen e Grupos Experimentais

O sêmen foi submetido à centrifugação a 600 G por 10 minutos para a remoção do plasma seminal e do diluente. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspenso com o mesmo diluente, a uma concentração de 50×10^6 espermatozoides/mL. O volume final foi fracionado em sete alíquotas contendo 200×10^6 espermatozoides, às quais foram adicionados os antioxidantes e o etanol.

Os antioxidantes foram adicionados ao sêmen diluído de acordo com os seguintes grupos experimentais: C – controle; Vit C – 0,65 mg/mL de vitamina C; AA2G – 200 μ M de ácido ascórbico 2-glicosídeo; α -Toh – 2 μ M de α -tocoferol; Vit C/ α -Toh – 0,65 mg/ml de vitamina C associado a 2 μ M de α -tocoferol; AA2G/ α -Toh – 200 μ M de ácido ascórbico 2-glicosídeo associado a 2 μ M de α -tocoferol, e; EtOH – 100 μ l de etanol, utilizado como controle positivo do solvente do α -Toh.

As amostras foram estocadas à temperatura de 5°C em contêiner isotérmico (CP; Nunes et al., 2008). O sêmen foi mantido sob refrigeração por 72 horas. Em intervalos de 24 horas os gelos recicláveis foram substituídos e as amostras de sêmen retiradas para as análises laboratoriais.

Avaliação Seminal

As avaliações seminais foram realizadas antes da refrigeração a 5°C e adição dos antioxidantes (M-0) e às 24 (M-24), 48 (M-48) e 72 (M-72) horas de refrigeração. Foram retirados 600 μ L de cada tratamento, em cada momento e mantidos em banho-maria a 37°C por 10 minutos. A seguir eram realizadas as análises de motilidade subjetiva, vigor, integridade da membrana plasmática, fragmentação da cromatina, atividade mitocondrial e peroxidação lipídica.

Motilidade e Vigor Espermático

A avaliação da motilidade e vigor foi do “tipo cega”, feita pelo mesmo técnico, depositando-se 10 µL de sêmen entre lâmina e lamínula, sob a microscopia de campo claro, mantidas a 37°C sobre mesa aquecedora (WTA, Cravinhos, São Paulo, Brasil) nas objetivas de 10 e 40x. O resultado foi expresso em porcentagem conforme a proporção total de espermatozoides móveis e o vigor segundo escala padronizada de zero a cinco (0-5).

Concentração Espermática

A concentração foi estimada após a colheita do sêmen e antes da refrigeração, usando-se uma taxa de diluição de 1:100, em Câmara de Neubauer. A contagem foi realizada sob a microscopia de campo claro, com objetiva de 40x, sendo os valores expressos em $\times 10^6$ espermatozoides/mL.

Integridade da Membrana Plasmática

A integridade da membrana plasmática (IMP) foi analisada pela técnica descrita por Harrison e Vickers (1990), em preparações úmidas coradas pela associação das sondas fluorescentes diacetato de 6-carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (PI). A IMP foi avaliada sob a microscopia de epifluorescência (Axioskop, Zeiss, Alemanha), usando filtro com excitação de 492 nm e emissão de 517 nm, com objetiva de 40x, sendo contadas 200 células e classificadas quanto ao padrão de coloração em duas categorias: íntegros - célula corada em verde em toda sua extensão e; lesados - núcleo corado em vermelho ou núcleo corado em vermelho e o acrossomo em verde.

Atividade Mitocondrial

A atividade mitocondrial foi avaliada empregando-se a coloração com 3,3'-diaminobenzidina (DAB), segundo técnica de Hrudka (1987), incubando-se 20 µL de sêmen + 20 µL do corante, por uma hora em banho-maria a 37°C. A seguir fazia-se o esfregaço, fixando-o em formol a 10% por 10 minutos. As lâminas foram analisadas em microscopia de contraste de fase, com aumento de 1000x. Foram contadas 200 células e classificadas de acordo com o grau de coloração da peça intermediária, em quatro classes: DAB I - peça intermediária totalmente corada, indicando alta atividade mitocondrial; DAB II - $\geq 50\%$ da peça intermediária corada,

indicando média a alta atividade mitocondrial; DAB III - peça intermediária < 50% corada, indicando baixa atividade mitocondrial e; DAB IV - ausência de coloração da peça intermediária, portanto, sem atividade mitocondrial.

Fragmentação da Cromatina

Para a análise da ocorrência de fragmentação da cromatina foi utilizado o azul de toluidina (ATOL), conforme técnica descrita por Belletti et al. (2004). Estendia-se o esfregaço com 25 µL de sêmen e, após estarem secas, as lâminas foram fixadas por um minuto em solução de etanol e ácido acético (3:1), posteriormente em etanol 70% por três minutos e, então, hidrolisadas por 20 minutos em ácido clorídrico a 4 mMol. Após a hidrólise, as lâminas foram lavadas com água deionizada e a secagem feita à temperatura ambiente.

As amostras foram avaliadas sob a microscopia de campo claro, em aumento de 1.250x. Para a leitura foram depositados 20 µL de solução de azul de toluidina a 0,025% em tampão McIlvaine entre lâmina e lamínula. Foi feita a contagem de 500 células por lâmina, considerando-se duas categorias: cromatina fragmentada - cabeça espermática corada em violeta ou azul escuro e; cromatina íntegra - cabeça espermática corada em azul claro.

Peroxidação Lipídica

O nível de LPO foi mensurado de forma indireta pela técnica do TBARS (Nichi et al., 2007), que consiste na mensuração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, induzida com vitamina C e ferro. A leitura foi feita por espectrofotometria, em comprimento de onda de 532 nm e os resultados comparados com uma curva padrão, previamente estabelecida, de malondialdeído (MDA). A concentração do TBARS foi determinada utilizando-se um coeficiente de extinção molar do malondialdeído ($1,56 \times 10^5 \times M \text{ ml}^{-1}$), e expressa em nanogramas de MDA por 1×10^8 espermatozoides.

Análise Estatística

O delineamento experimental foi em parcelas subdivididas, considerando-se a adição da Vit C, AA2G, α -Toh e suas associações como tratamento e os momentos de avaliação como subparcelas. Para comparar as variáveis dependentes (motilidade/vigor, integridade da membrana plasmática, fragmentação da cromatina,

atividade mitocondrial e lipoperoxidação) empregou-se a análise de variância, pelo procedimento GLM do Programa Estatístico SAS (2001), considerando-se os efeitos fixos de tratamento e momentos de avaliação seminal. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan, em nível de 5% de significância. As variáveis expressas em porcentagem foram transformadas em arco seno ($x/100$) como sugerido por Sampaio (2007).

RESULTADOS

Os valores médios encontrados no M-0 foram: motilidade - $78,0 \pm 4,1\%$; vigor - $3,6 \pm 0,5$; espermatozoides íntegros - $73,1 \pm 15,9\%$; DAB I - $38,3 \pm 17,1\%$; DNA fragmentado - $3,9 \pm 1,6\%$ e peroxidação lipídica - $1.543,5 \pm 1.295,2$ ng de MDA/ 10^8 espermatozoides.

Foi encontrada redução significativa dos valores das variáveis motilidade, vigor, íntegros e DAB I em função do tempo de armazenamento. Os valores médios (\pm desvio padrão) obtidos nos momentos M-24, M-48 e M-72 são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Variáveis do sêmen equino ($n = 20$) acrescido de antioxidantes e submetido à refrigeração a 5°C por 72 h em função dos momentos avaliados

Variáveis Espermáticas	Tempo de Refrigeração (horas)		
	M-24	M-48	M-72
Motilidade (%)	$69,2 \pm 13,7^{a**}$	$57,7 \pm 19,6^b$	$50,8 \pm 22,0^c$
Vigor (0-5)	$3,5 \pm 0,7^a$	$3,1 \pm 0,8^b$	$2,8 \pm 0,9^c$
Íntegros (%)	$33,4 \pm 12,6^a$	$27,2 \pm 10,7^b$	$24,0 \pm 9,5^c$
DNA Fragmentado (%)	$4,2 \pm 1,4$	$4,5 \pm 1,4$	$4,5 \pm 1,4$
DAB I* (%)	$23,2 \pm 13,3^a$	$13,4 \pm 8,7^b$	$8,7 \pm 6,1^c$
TBARS (ng)			
MDA/ 10^8 sptz)	$2.120,9 \pm 746,7$	$2.067,6 \pm 828,4$	$2.107,3 \pm 859,0$

* DAB I = alta atividade mitocondrial de acordo com as classes do teste de 3-3'-diaminobenzidina; TBARS = espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico; MDA = malondialdeído; sptz = espermatozoide

**Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre médias pelo teste de Duncan ($p < 0,05$)

Não foi observado efeito significativo da interação entre tratamentos e momentos. Para a variável motilidade não houve diferença entre os grupos AA2G e α -Toh, no entanto, quando comparado com os outros tratamentos o AA2G apresentou superioridade. Por outro lado, a Vit C isolada ou em associação com o α -Toh apresentou os menores valores de motilidade (Tabela 2). O AA2G também proporcionou um aumento significativo do vigor espermático em comparação aos demais tratamentos e, da mesma forma, a Vit C isolada ou em associação com a α -Toh promoveu sua diminuição.

Todos os antioxidantes testados reduziram a peroxidação lipídica, não apresentando diferença significativa entre os tratamentos, porém com valores significativamente inferiores aos grupos Controle e EtOH.

Tabela 2. Variáveis avaliadas no sêmen equino diluído (n = 20) acrescido de antioxidantes e submetido à refrigeração a 5°C por 72

h

Variáveis	Tratamentos						
	C**	EtOH	Vit C	AA2G	α-Toh	Vit C / α-Toh	AA2G / α-Toh
Mot (%)*	62,1 ± 16,2 ^{bc****}	58,1 ± 8,6 ^{cd}	50,4 ± 22,7 ^e	68,4 ± 18,1 ^a	65,0 ± 17,7 ^{ab}	51,9 ± 21,5 ^{de}	58,7 ± 20,1 ^{bc}
Vigor (1-5)	3,4 ± 0,7 ^b	3,2 ± 0,6 ^b	2,5 ± 0,9 ^c	3,7 ± 0,7 ^a	3,4 ± 0,7 ^b	2,7 ± 0,8 ^c	3,2 ± 0,8 ^b
Ínt (%)	30,3 ± 13,0	25,9 ± 10,3	29,8 ± 12,7	29,2 ± 11,1	28,6 ± 11,0	27,5 ± 12,3	26,2 ± 10,6
Frag (%)	4,6 ± 1,5	4,7 ± 1,3	4,5 ± 1,5	4,3 ± 1,4	4,3 ± 1,3	4,2 ± 1,4	4,4 ± 1,3
DAB I (%)	16,3 ± 13,2	13,2 ± 12,4	15,2 ± 11,7	16,6 ± 12,1	16,4 ± 10,4	13,5 ± 10,9	14,3 ± 9,8
TBARS***	2.506,2 ± 796,4 ^a	2.636,5 ± 1.100,3 ^a	2.015,8 ± 622,8 ^b	1957,9 ± 598,9 ^b	1.890,8 ± 749,5 ^b	1.869,4 ± 677,1 ^b	1813,5 ± 624,8 ^b

*Mot = Motilidade; Ínt = Íntegros; Frag = DNA fragmentado; DAB I = alta atividade mitocondrial de acordo com as classes do teste de 3,3'- diaminobenzidina; TBARS = Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

**C = Controle; EtOH = 100 µl de etanol, controle positivo do solvente do α-tocoferol; Vit C = 0,65 mg/mL de vitamina C; AA2G = 200 µM de ácido ascórbico 2-glicosídeo; α-Toh = 2 µM de α-tocoferol; Vit C/ α-Toh = 0,65 mg/mL de vitamina C + 2 µM de α-tocoferol; AA2G/ α-Toh = 200 µM de ácido ascórbico 2-glicosídeo + 2 µM de α-tocoferol

***Unidade do TBARS = ng de malondialdeído / 10⁸ espermatozoides

****Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre médias pelo teste de Duncan (p<0,05)

DISCUSSÃO

A Vit. C é considerada o antioxidante extracelular mais importante (Rose e Bode, 1993), no entanto, é um composto instável em condições oxidativas ou na presença de íons metálicos, sendo rapidamente inativada (Ferreira e Matsubara, 1997; Frei e Lawson, 2008). Apesar de atuar contra as ROS e evitar a peroxidação lipídica, Aurich et al. (1997) e Ball et al. (2001) não encontraram aumento significativo da motilidade com a adição de 0,45 mg/mL de ácido ascórbico ao sêmen equino refrigerado por 96 h, porém essa concentração de Vit. C mostrou resultados superiores quanto a integridade da membrana plasmática (Aurich et al., 1997). No presente experimento, a adição de 0,65 mg/mL de Vit. C isolada ou em associação com α -Tch, resultou em diminuição da motilidade e vigor espermáticos, mas não alterou a integridade da MP. Concentrações mais altas de Vit. C, como 0,9 mg/mL têm efeito deletério sobre a motilidade e a integridade da MP (Aurich et al., 1997), portanto, é possível que a dose testada neste experimento esteja próxima do limite tóxico para o espermatozoide, devido à diminuição da motilidade e vigor espermático.

O AA2G é uma forma mais estável da Vit. C, composta por uma molécula de glicose unida ao carbono 2 da molécula de ácido ascórbico, formando uma ligação do tipo O-glicosídeo (Takebayashi et al., 2006) que o torna mais resistente à degradação térmica ou oxidativa (Yamamoto et al., 1990), além de proporcionar uma ação mais lenta e mais longa em comparação à Vit. C (Takebayashi et al., 2003).

A adição de AA2G na concentração de 200 μ M ao diluidor de refrigeração aumentou a motilidade e o vigor do espermatozoide equino. Resultados semelhantes foram observados no sêmen congelado de suínos, em que utilizando a concentração de 200 μ M de AA2G, apresentou resultados superiores na motilidade e integridade de membrana após a descongelação (Yoshimoto et al., 2008). No presente trabalho, o AA2G não diferiu significativamente dos outros tratamentos na análise da integridade de membrana, no entanto, a congelação submete a célula espermática a situações mais extremas que o processo de refrigeração, talvez por isso o efeito protetor do AA2G tenha sido evidenciado no experimento de Yoshimoto et al. (2008) e não neste.

Em humanos a adição de 100 μ M de AA2G ao diluidor de congelação também resultou em aumento significativo da motilidade (Jenkins et al., 2011). O

AA2G pode contribuir com alguns eventos celulares fisiológicos quando hidrolisado enzimaticamente (Yamamoto et al., 1990) e, sob a ação da α -glicosidase ou esterases podem ser gerados dois compostos distintos: ácido ascórbico e glicose (Fujinami et al., 2001). Desta forma, o AA2G teria uma dupla função, atuando como um antioxidante mais estável que a Vit. C e como fonte de energia para o espermatozoide. A hidrolização do AA2G, liberando moléculas de glicose, talvez possa explicar os melhores resultados observados para a motilidade e vigor, visto que o espermatozoide equino possui esterases (Salazar et al., 2000).

Existem dois mecanismos de transporte para a incorporação celular da vitamina C em mamíferos: através de proteínas identificadas como *sodium vitamin C transporters* (SVCT), que fazem a incorporação da forma reduzida do ácido ascórbico, e pela ação das proteínas transportadoras de glicose (*glucose transporters* – GLUT), que auxiliam no transporte da forma oxidada da Vit. C, o ácido desidroascórbico (Nualart et al., 2014). Embora existam cinco tipos de GLUT descritas no sêmen equino (Varner et al., 2014), o mecanismo de incorporação da Vit. C e do AA2G ainda não está totalmente elucidado. Caso o AA2G passe pelo processo de hidrólise enzimática, as moléculas de glicose liberadas podem ser transportadas pelas GLUTs e, então, fosforiladas em glicose 6-fosfato pela enzima fosfohexoisomerase (Peña et al., 2009), entrando, assim no metabolismo glicolítico de geração de energia.

A adição de 2 μ M de α -Toh não alterou significativamente as variáveis motilidade, vigor, integridade de membrana e fragmentação da cromatina. Os resultados obtidos neste estudo foram semelhantes ao relatado por Ball et al. (2001) para a mesma concentração de α -Toh. Almeida e Ball (2005), testando 5 μ M de α -tocoferol, também não encontraram diferença significativa para a motilidade.

Os antioxidantes testados não tiveram efeito sobre a integridade da MP nem diminuíram os níveis de fragmentação da cromatina. De acordo com Linfor e Meyers (2002), a refrigeração aumenta a fragmentação do DNA do espermatozoide, porém neste experimento esse fato não foi observado. Os valores obtidos na classe de DNA fragmentado foram inferiores aos descritos por Morrel et al. (2008), que relataram média de 11,6% usando a sonda fluorescente *acridine orange*, mas foram próximos aos descritos por Naves et al. (2004), que obtiveram no sêmen fresco 6,2% de fragmentados pela técnica do azul de toluidina e 3,3% para o *acridine orange*, com correlação significativa ($r = 0,55$) entre as técnicas. O estresse oxidativo

está entre as principais causas da fragmentação do DNA e essas anormalidades podem resultar em infertilidade (Agarwal e Said, 2003). De acordo com Evenson e Jost (2000), o potencial de fertilidade em garanhões é considerado baixo quando a taxa de fragmentação de DNA é superior a 30%, e é alto quando a fragmentação é inferior a 15%. Love (2005), em um levantamento relacionando a fragmentação de DNA com a fertilidade de garanhões, relatou que os animais com alta fertilidade apresentavam taxa de prenhez por ciclo estral de 82% e 12% de fragmentação de DNA pelo teste do *acridine orange*, enquanto que os animais com baixa fertilidade tinham 39% de taxa de prenhez por ciclo estral e 25% de espermatozoides com DNA fragmentado.

O teste do DAB permite a avaliação da quantidade de citocromo C presente na peça intermediária do espermatozoide, que por sua vez está relacionado com o metabolismo aeróbico desta célula (Hrudka, 1987). Na análise da atividade mitocondrial em função do tempo de armazenamento, pode-se notar que houve uma diminuição da categoria DAB I, que reflete o gasto energético nesse período. Na comparação entre os tratamentos, não foi observada diferença significativa na categoria DAB I. Yoshimoto et al. (2008) relataram aumento da concentração de ATP no espermatozoide suíno após a descongelação de amostras suplementadas *in vitro* com AA2G. O metabolismo glicolítico e da fosforilação oxidativa (OXIPHOS) ocorrem em compartimentos diferentes, enquanto a OXIPHOS acontece nas mitocôndrias, a glicólise se dá nas fibras externas densas do flagelo através de uma série de enzimas glicolíticas (Ferramosca e Zara, 2014). No entanto, grande parte da geração de energia vem da OXIPHOS no caso do espermatozoide equino (Gibb et al., 2014). Desta forma, pode-se supor que o AA2G contribuiu para a geração de energia através do metabolismo glicolítico, agindo em concomitância com a OXIPHOS, tendo em vista que houve aumento da motilidade, mas não houve diferença na atividade mitocondrial.

Os antioxidantes testados foram eficazes em prevenir a LPO e não diferiram entre si quanto ao grau de proteção contra as ROS. De fato, a proteção antioxidante da Vit. C, AA2G e α -Toh sobre o espermatozoide de mamíferos já havia sido observada isoladamente (Almeida e Ball, 2005; Yoshimoto et al., 2008; Franco et al., 2013). Porém, a hipótese de que a associação entre a Vit. C/ α -Toh e AA2G/ α -Toh pudesse proporcionar melhores resultados ao sêmen refrigerado não se confirmou, visto que, com exceção da análise da peroxidação lipídica, não houve benefício para

as outras variáveis analisadas neste experimento. No entanto, diferente de outras espécies domésticas, nos equinos foi observada correlação positiva entre a peroxidação lipídica e a fertilidade. Os autores concluíram que o nível mais elevado de estresse oxidativo seria consequência de uma maior atividade mitocondrial observada no sêmen de melhor qualidade e, no caso do sêmen submetido à preservação, esse pode ser um fator prejudicial ao espermatozoide (Gibb et al., 2014).

Conclui-se, com este experimento, que os antioxidantes testados diminuíram a lipoperoxidação da célula espermática equina submetida à refrigeração a 5°C por 72 h. Além disso, o AA2G proporcionou aumento da motilidade espermática durante o período de armazenamento. Recomenda-se mais estudos buscando avaliar os efeitos da adição de AA2G em associação com outros antioxidantes, bem como explorar seu comportamento frente à congelação do sêmen equino e seus resultados sobre a fertilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, A., SAID, T.M. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. **Human Reproduction**, v.9, p.331-345, 2003.

AGARWAL, A., VIRK, G., ONG, C., PLESSIS, S.S. Effect of oxidative stress on male reproduction. **World Journal of Men's Health**, v.32, p.1-17, 2014.

AITKEN, R.J., SMITH, T.B., JOBLING, M.S., BAKER, M.A., DE IULIIS, G.N. Oxidative stress and male reproductive health. **Asian Journal of Andrology**, v.13, p.31-38, 2014.

ALMEIDA, J., BALL, B.A. Effect of α -tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.87, p.321-337, 2005.

AURICH, J.E., SCHÖNHERR, L.U., HOPPE, T.H., AURICH, C. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. **Theriogenology**, v.48, p.185-192, 1997.

BALL, B.A., MEDINA, V., GRAVANCE, C.G., BAUMBER, J. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. **Theriogenology**, v.56, p.577-589, 2001.

BAUMBER, J., BALL, B.A., GRAVANCE, C.G., MEDINA, V., DAVIES-MOREL, M.C.G. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. **Journal of Andrology**, v.21, p.895-902, 2000.

BELETTI, M.E., COSTA, L.F., VIANA, M.P. A computational approach to characterization of bovine sperm chromatin alterations. **Biotechnic & Histochemistry**, v.79, n.1, p. 17-23, 2004.

BETTERIDGE, D.J. What is oxidative stress? **Metabolism**, Suppl.1, v.49, p.3-8, 2000.

BURNAUGH, L., SABEUR, K., BALL, B.A. Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium. **Theriogenology**, v.67, p.580-589, 2007.

EVENSON, D.P.; JOST, L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. **Methods in Cell Science**, v.22, p.169-189, 2000.

FERRAMOSCA, A., ZARA, V. Bioenergetics of mammalian sperm capacitation. **Biomed Research International**, v.2014, p.1-8, 2014.

FERREIRA, A.L.A, MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, p.61-68, 1997.

FRANCO, J.S.V., CHAVEIRO, A., GÓIS, A., SILVA, F.M. Effects of α -tocopherol and ascorbic acid on equine semen quality after cryopreservation. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.33, p.787-793, 2013.

FREI, B., LAWSON, S. Vitamin C and cancer revisited. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.105, p.11037-11038, 2008.

FUJINAMI, Y., TAI, A., YAMAMOTO, I. Radical scavenging activity against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl of ascorbic acid 2- α -glucoside (AA-2G) and 6-acyl-AA-2G. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.49, p.642-644, 2001.

GIBB, Z.; LAMBOURNE, S.R.; AITKEN, R.J. The paradoxical relationship between stallion fertility and oxidative stress. **Biology of Reproduction**, v.91, p.1-10, 2014.

HARRISON, R.A.P., VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, p.343-352, 1990.

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, p.809-828, 1987.

JENKINS, T.G., KENNETH, B.S., ASTON, I., CARRELL, D.T. Supplementation of cryomedium with ascorbic acid-2-glucoside (AA2G) improves human sperm post-thaw motility. **Fertility and Sterility**, v.95, p.2001-2004, 2011.

JIALAL, I., VEGA, G.L., GRUNDY, S.M. Physiologic levels of ascorbate inhibit the oxidative modification of low density lipoprotein. **Atherosclerosis**, v.82, p.185-192, 1990.

LINFOR, J.J., MEYERS, S.A. Detection of DNA damage in response to cooling injury in equine spermatozoa using single-cell gel electrophoresis. **Journal of Andrology**, v.23, p.107-113, 2002.

LOVE, C.C. The sperm chromatin structure assay: a review of clinical applications. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.39-45, 2005.

MORRELL, J.M., JOHANNISSON, A., DALIN, A.M., HAMMAR, L., SANDEBERT, T., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warmblood stallions and their relationship to pregnancy rates. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.50, n.2, p.1-7, 2008.

NAVES, C.S., BELETTI, M.E., DUARTE, M.B., VIEIRA, R.C., DINIZ, E.G., JACOMINI, J.O. Avaliação da cromatina espermática em equinos com azul de toluidina e "acridine orange". **Bioscience Journal**, v.20, p.117-124, 2004.

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 epididymis stored at 4 and 34°C. **Theriogenology**, v.67, p.334-340, 2007.

NUALART, F., MACK, L., GARCÍA, A., CISTERNAS, P., BONGARZONE, E.R., HEITZER, M., JARA, N., MARTÍNEZ, F., FERRADA, L., ESPINOZA, F., BAEZA, V., SALAZAR, K. Vitamin C transporters, recycling and the bystander effect in the nervous system: SVCT2 versus GLUTs. **Journal of Stem Cell Research & Therapy**, v.4, p.1-23, 2014.

NUNES, D.B., ZORZATTO, J.R. COSTA E SILVA, E.V., ZÚCCARI, C.E.S.N. Efficiency of short-term storage of equine semen in a simple-design cooling system. **Animal Reproduction Science**, v.104, p.434-439, 2008.

PEÑA, F.J., RODRÍGUEZ MARTÍNEZ, H., TAPIA, J.A., ORTEGA FERRUSOLA, C., GONZALEZ FERNANDEZ, L.G., MACÍAS GARCÍA, B. Mitochondria in mammalian

sperm physiology and pathology: A review. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44, p.345-349, 2009.

ROSE, R.C., BODE, A.M. Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate. **Faseb Journal**, v.7, p.1135-1142, 1993.

SALAZAR, P., GRAHAM, J.K., PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J., SQUIRES, E.L. Indirect determination of stallion sperm capacitation based on esterase release from spermatozoa challenged with lysophosphatidylcholine. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v.56, p.407-414, 2000.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 3.ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2007. 264p.

SANOCKA, D., KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.2, p.1-7, 2004.

SAS – Statistical Analysis System. SAS/STAT software, Version 8.02, Cary: 2001.

TAKEBAYASHI, J., TAI, A., YAMAMOTO, I. pH-dependent long-term radical scavenging activity of AA-2G and 6-Octa-AA-2G against 2,29-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.26, p.1368-1370, 2003.

TAKEBAYASHI, J., TAI, A., GOHDA, E., YAMAMOTO, I. Characterization of the radical-scavenging reaction of 2-O-Substituted ascorbic acid derivatives, AA-2G, AA-2P, and AA-2S: A kinetic and stoichiometric study. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.29, p.766-771, 2006.

VARNER, D.D.; GIBB, Z.; AITKEN, R.J. Stallion fertility: a focus on the spermatozoon. **Equine Veterinary Journal**, v.47, n.1, p.16-24, 2014.

YAMAMOTO, I., MUTO, N., NAGATA, E., NAKAMURA, T., SUZUKI, Y. Formation of a stable L-ascorbic acid α -glucoside by mammalian α -glucosidase-catalyzed transglucosylation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1035, p.48-50, 1990.

YOSHIMOTO, T., NAKAMURA, S., YAMAUCHI, S., MUTO, N., NAKADA, T., ASHIZAWA K., TATEMOTO, H. Improvement of the post-thaw qualities of Okinawan native pig spermatozoa frozen in an extender supplemented with ascorbic acid 2-O- α -glucoside. **Cryobiology**, v.57, p.30-36, 2008.

CAPÍTULO 3

Efeito do ácido docosahexaenoico e α -tocoferol no sêmen equino submetido à refrigeração por 72 horas

Breno Fernandes Barreto Sampaio¹, Carmem Estefânia Serra Neto Zúccari²

¹Doutorando no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

²Profa. Dra. da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Resumo: O objetivo do presente experimento foi avaliar os efeitos da adição do ácido docosahexaenoico (DHA) e do antioxidante lipossolúvel α -tocoferol (α -Toh) ao diluidor, isoladamente e em associação, sobre as variáveis seminais do espermatozoide equino submetido à refrigeração por 72 horas. Foram utilizados dois ejaculados de dez garanhões e avaliados quanto à motilidade, vigor, integridade da membrana plasmática, fragmentação da cromatina, atividade mitocondrial e peroxidação lipídica de acordo com os seguintes tratamentos: C – controle; DHA – 10 ng/mL de ácido docosahexaenoico; α -Toh – 2 μ M de α -tocoferol; DHA/ α -Toh – 10 ng/mL de ácido docosahexaenoico associado a 2 μ M de α -tocoferol; EtOH 40 – 40 μ L de etanol, Etho 100 – 100 μ L de etanol, e; EtOH 140 – 140 μ L de etanol. Não foi observada diferença significativa na motilidade e vigor entre o grupo controle e os grupos tratados com DHA e α -Toh isoladamente, no entanto a associação dos dois compostos resultou em diminuição dessas variáveis espermáticas. Na análise da peroxidação lipídica o grupo controle apresentou $2.506,2 \pm 796,4$ ng de MDA x 10^8 espermatozoides, valor que foi significativamente superior aos grupos tratados com o DHA e com o α -Toh. Conclui-se que o α -Toh foi eficaz em reduzir a peroxidação lipídica do espermatozoide equino submetido à refrigeração e que o DHA, apesar de ser um ácido graxo poli-insaturado com alta susceptibilidade à peroxidação, também exerceu um efeito antioxidante.

Palavras-chave: antioxidante, DHA, espermatozoide, garanhão, vitamina E

INTRODUÇÃO

Algumas biotécnicas da reprodução vêm sendo utilizadas com frequência pelos criadores de equinos, e, dentre as mais comuns, pode-se incluir a inseminação artificial (IA) com sêmen refrigerado. Normalmente, o armazenamento a 5°C permite o uso do material genético em até 48 horas, sem quedas drásticas da fertilidade (Aurich, 2008).

Durante o processo de refrigeração seminal ocorre a transição de fase dos lipídeos da membrana plasmática (MP) entre 19 e 8°C, passando do estado líquido cristalino para o estado gel. Nesse período ocorre alteração da organização dos componentes da MP, bem como diminuição da sua fluidez, o que torna o espermatozoide mais susceptível ao choque térmico pelo frio e à ruptura da MP, comprometendo a função da célula espermática (Amman e Pickett, 1987; Aurich, 2005).

A composição lipídica da MP determina a temperatura em que ocorre a transição de fase, sendo que a maior quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (*polyunsaturated fatty acids* – PUFA) e o grau de insaturação proporcionam maior fluidez, mantendo essa estrutura no estado líquido-cristalino em temperaturas mais baixas quando comparada às membranas com conformação mais rígida (Giraud et al., 2000).

O ácido docosahexaenoico (*docosahexaenoic acid* – DHA) possui 22 átomos de carbono e seis duplas ligações em sua cauda hidrocarbonada, o que permite alta versatilidade à sua apresentação espacial, permitindo modificá-la a intervalos de picosegundos ou nanosegundos. Essa propriedade favorece a fluidez da MP (Garwrisch et al., 2003). Os espermatozoides de mamíferos possuem uma alta concentração de DHA (Neil e Masters, 1972; Castellini et al., 2000), principalmente na região da cauda, onde há a necessidade de maior flexibilidade da MP devido ao movimento flagelar (Connor et al., 1998).

A adição de DHA no diluente promove sua incorporação na MP do espermatozoide (Nasiri et al., 2012; Towhidi e Parks, 2012) e o aumento de PUFA na MP pode contribuir com a motilidade do espermatozoide submetido ao armazenamento (Takahashi et al., 2012). No entanto, as duplas ligações encontradas nos PUFA os tornam susceptíveis à peroxidação lipídica, iniciada principalmente pelo radical hidroxila, levando a uma reação em cascata (Ball e Vo,

2002) que altera a fluidez da MP, podendo comprometer eventos fisiológicos relacionados à fecundação, como, por exemplo, a reação do acrossomo (Sanocka e Kurpisz, 2004).

O plasma seminal possui substâncias relacionadas com a proteção antioxidante como a catalase, glutathione reduzida, glutathione peroxidase, vitamina C, α -tocoferol (α -Toh), coenzima Q, taurina, hipotaurina e piruvato (Ball, 2008), porém, a diluição do sêmen diminui a concentração disponível desses antioxidantes (Nasiri et al., 2012), reduzindo, assim, a proteção contra os efeitos nocivos do estresse oxidativo.

O α -Toh pode ser incorporado à MP e tem a capacidade de estabilizá-la, conferindo um aspecto mais organizado (Howard et al., 2011), além de protegê-la contra o ataque dos radicais livres às duplas ligações dos PUFAs (Tran et al., 1996). A adição de α -Toh ao sêmen equino refrigerado resultou na diminuição dos níveis de peroxidação lipídica (Almeida e Ball, 2005) e, sua associação com DHA melhorou a motilidade e a viabilidade espermática do sêmen bovino criopreservado (Nasiri et al., 2012; Thowidi e Parks, 2012).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da adição ao diluidor do ácido docosahexaenoico e do α -tocoferol, isoladamente e em associação, sobre as variáveis do sêmen equino submetido à refrigeração por 72 horas.

MATERIAL E MÉTODOS

Colheita e Transporte do Sêmen

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (20° 26' 34" S; 54° 38' 47" W), durante o período de estação de monta.

Foram utilizados dois ejaculados de dez garanhões adultos de fertilidade comprovada, com idades entre 6 e 17 anos. Somente ejaculados que apresentaram motilidade $\geq 70\%$ e vigor ≥ 3 após a colheita foram submetidos à refrigeração.

Para a colheita de sêmen foi utilizada a vagina artificial modelo Botucatu (Botupharma®, Botucatu, São Paulo, Brasil), mantida a uma temperatura entre 42 e 45°C e as colheitas foram realizadas com auxílio de manequim ou de uma fêmea em estro.

Após a colheita do sêmen e avaliação das características seminais, uma alíquota contendo $1,4 \times 10^9$ de espermatozoides foi diluída em meio de centrifugação a base de leite desnatado (Equimix[®], Nutricell, Campinas, São Paulo, Brasil) a uma concentração de 50×10^6 espermatozoides/mL. O transporte até o laboratório foi feito em contêiner a 15°C (Max-Sêmen[®]; EHG Agrofarma, Mogi-Mirim, São Paulo, Brasil) em intervalo máximo de 1 hora após a colheita.

Processamento do Sêmen e Grupos Experimentais

O sêmen foi submetido à centrifugação a 600 G por 10 minutos para a remoção do plasma seminal e do diluente. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspenso com o mesmo diluente, a uma concentração de 50×10^6 espermatozoides/mL. O volume final foi fracionado em sete alíquotas contendo 200×10^6 espermatozoides, às quais foram adicionados os antioxidantes e o etanol.

Os reagentes foram adicionados ao sêmen diluído de acordo com os seguintes grupos experimentais: C – controle; DHA – 10 ng/mL de ácido docosahexaenoico; α -Toh – 2 μ M de α -tocoferol; DHA/ α -Toh – 10 ng/mL de ácido docosahexaenoico associado a 2 μ M de α -tocoferol; EtOH 40 – 40 μ L de etanol, EtOH 100 – 100 μ L de etanol, e; EtOH 140 – 140 μ L de etanol. Os grupos em que foram adicionados os diferentes volumes de etanol correspondem ao controle positivo do solvente do DHA, do α -Toh e da associação dos dois compostos, respectivamente.

As amostras foram estocadas à temperatura de 5°C em contêiner isotérmico (CP; Nunes et al., 2008). O sêmen foi mantido sob refrigeração por 72 horas. Em intervalos de 24 horas os gelos recicláveis eram substituídos e as amostras de sêmen retiradas para as análises laboratoriais.

Avaliação Seminal

As avaliações seminais foram realizadas antes da refrigeração e adição dos antioxidantes (M-0) e às 24 (M-24), 48 (M-48) e 72 (M-72) horas de refrigeração. Foram retirados 600 μ L de cada tratamento, em cada momento e mantidos em banho-maria a 37°C por 10 minutos. A seguir eram realizadas as análises de motilidade subjetiva, vigor, integridade de membrana plasmática, fragmentação de cromatina, atividade mitocondrial e peroxidação lipídica.

Motilidade e Vigor Espermático

A avaliação da motilidade e vigor foi do “tipo cega” e feita pelo mesmo técnico, depositando-se 10 µL de sêmen entre lâmina e lamínula, sob a microscopia de campo claro, mantidas a 37°C sobre mesa aquecedora (WTA, Cravinhos, São Paulo, Brasil) nas objetivas de 10 e 40x. O resultado foi expresso em percentagem conforme a proporção total de espermatozoides móveis e o vigor segundo escala padronizada de zero a cinco (0-5).

Concentração Espermática

A concentração foi estimada após a colheita de sêmen e antes da refrigeração, usando-se uma taxa de diluição de 1:100, em Câmara de Neubauer. A contagem foi realizada sob a microscopia de campo claro, com objetiva de 40x, sendo os valores expressos em $\times 10^6$ espermatozoides/mL.

Integridade da Membrana Plasmática

A integridade da membrana plasmática (IMP) foi analisada pela técnica descrita por Harrison e Vickers (1990), em preparações úmidas coradas pela associação das sondas fluorescentes diacetato de 6-carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (PI). A IMP foi avaliada sob a microscopia de epifluorescência (Axioskop, Zeiss, Alemanha), usando filtro com excitação de 492 nm e emissão de 517 nm, com objetiva de 40x, sendo contadas 200 células e classificadas quanto ao padrão de coloração em duas categorias: íntegros - célula corada em verde em toda sua extensão e; lesados - núcleo corado em vermelho ou núcleo corado em vermelho e o acrossomo em verde.

Atividade Mitocondrial

A atividade mitocondrial foi avaliada empregando-se a coloração com 3,3'-diaminobenzidina (DAB), segundo técnica de Hrudka (1987), incubando-se 20 µL de sêmen + 20 µL do corante, por uma hora em banho-maria a 37°C. A seguir fazia-se o esfregaço, fixando-o em formol a 10% por 10 minutos. As lâminas foram analisadas em microscopia de contraste de fase, com aumento de 1000x. Foram contadas 200 células e classificadas de acordo com o grau de coloração da peça intermediária, em quatro classes: DAB I - peça intermediária totalmente corada, indicando alta atividade mitocondrial; DAB II - $\geq 50\%$ da peça intermediária corada, indicando média a alta atividade mitocondrial; DAB III - peça intermediária $< 50\%$

corada, indicando baixa atividade mitocondrial e; DAB IV - ausência de coloração da peça intermediária, portanto, sem atividade mitocondrial.

Fragmentação da Cromatina

Para a análise da ocorrência de fragmentação da cromatina foi utilizado o azul de toluidina (ATOL), conforme técnica descrita por Belletti et al. (2004). Estendia-se o esfregaço com 25 µL de sêmen e, após estarem secas, as lâminas foram fixadas por um minuto em solução de etanol e ácido acético (3:1), posteriormente em etanol 70% por três minutos e, então, hidrolisadas por 20 minutos em ácido clorídrico a 4 mMol. Após a hidrólise, as lâminas foram lavadas com água deionizada e a secagem feita a temperatura ambiente.

As amostras foram avaliadas sob a microscopia de campo claro, em aumento de 1.250x. Para a leitura foram depositados 20 µL de solução de azul de toluidina a 0,025% em tampão McIlvaine entre lâmina e lamínula. Foi feita a contagem de 500 células por lâmina, considerando-se duas categorias: cromatina fragmentada - cabeça espermática corada em violeta ou azul escuro e; cromatina íntegra - cabeça espermática corada em azul claro.

Peroxidação Lipídica

O nível de LPO foi mensurado de forma indireta pela técnica do TBARS (Nichi et al., 2007), que consiste na mensuração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, induzida com vitamina C e ferro. A leitura foi feita por espectrofotometria, em comprimento de onda de 532 nm e os resultados comparados com uma curva padrão, previamente estabelecida, de malondialdeído (MDA). A concentração do TBARS foi determinada utilizando-se um coeficiente de extinção molar do malondialdeído ($1,56 \times 10^5 \times M \text{ mL}^{-1}$), e expressa em nanogramas de MDA por 1×10^8 de espermatozoides.

Análise Estatística

O delineamento experimental foi em parcelas subdivididas, considerando-se a adição de DHA, α -Toh e a associação dos dois compostos como tratamento e os momentos de avaliação como subparcelas. Para comparar as variáveis dependentes (motilidade/vigor, integridade da membrana plasmática, fragmentação da cromatina, atividade mitocondrial e lipoperoxidação) empregou-se a análise de variância, pelo

procedimento GLM do Programa Estatístico SAS (2001), considerando-se os efeitos fixos de tratamento e momentos de avaliação seminal. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan, em nível de 5% de significância. As variáveis expressas em porcentagem foram transformadas em arco seno ($x/100$) como sugerido por Sampaio (1998).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios obtidos no M-0 para as variáveis analisadas apresentaram-se da seguinte maneira: motilidade - $78,0 \pm 4,1\%$; vigor - $3,6 \pm 0,5$; espermatozoides íntegros - $73,1 \pm 15,9\%$; DAB I - $38,3 \pm 17,1\%$; DNA fragmentado - $3,9 \pm 1,6\%$; e peroxidação lipídica - $1.543,5 \pm 1.295,2$ ng de MDA/ 10^8 espermatozoides. Não foi observado efeito significativo da interação entre tratamentos e momentos.

As variáveis motilidade, vigor e DAB I apresentaram diminuição progressiva em função do tempo de armazenamento. A integridade da membrana plasmática não diferiu entre os momentos M-48 e M-72, sendo inferiores ao M-24 e houve aumento da fragmentação do DNA no M-72 em relação ao M-24. Por outro lado, a peroxidação lipídica não aumentou durante o período de armazenamento (Tabela 1).

As amostras de sêmen tratadas com DHA e α -Toh não apresentaram melhora nas variáveis motilidade e vigor (Tabela 2). Os resultados da adição de α -Toh estão de acordo com os descritos por Ball et al. (2001) e Almeida e Ball (2005), que também não encontraram diferença entre o grupo controle e os grupos suplementados com α -Toh. Porém, no sêmen humano de baixa qualidade, a adição *in vitro* de α -Toh resulta em maior motilidade, provavelmente devido à neutralização das espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* – ROS) produzidas em excesso pelos espermatozoides com alterações morfológicas (Keshtgar et al., 2012).

Tabela 1. Variáveis do sêmen equino (n = 20) acrescido de antioxidantes e submetido à refrigeração a 5°C por 72 h em função dos momentos avaliados

Variáveis Espermáticas	Tempo de Refrigeração (horas)		
	M-24	M-48	M-72
Motilidade (%)	69,0 ± 13,1 ^{a**}	57,8 ± 17,8 ^b	52,6 ± 20,0 ^c
Vigor (1-5)	3,6 ± 0,6 ^a	3,2 ± 0,7 ^b	2,9 ± 0,7 ^c
Íntegros (%)	32,0 ± 11,2 ^a	26,0 ± 9,5 ^b	23,6 ± 9,9 ^b
DNA Fragmentado (%)	4,3 ± 1,4 ^a	4,5 ± 1,2 ^{ab}	4,7 ± 1,3 ^b
DAB I* (%)	23,1 ± 14,6 ^a	13,7 ± 8,8 ^b	8,6 ± 6,4 ^c
TBARS (ng MDA/10 ⁸ sptz)	2.280,4 ± 841,8	2.178,8 ± 904,4	2.285,9 ± 914,1

* DAB I = alta atividade mitocondrial de acordo com as classes do teste de 3,3'- diaminobenzidina; TBARS = Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico; MDA = malondialdeído; sptz = espermatozoide

**Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre médias pelo teste de Duncan (p<0,05)

A adição de DHA ao meio promove a incorporação deste PUFA nas membranas celulares (Wassal e Stillwell, 2009), alterando sua composição através do aumento da proporção n-3:n-6 (Towhidi e Parks, 2012), bem como de PUFAs:ácidos graxos saturados (Nasiri et al., 2012). Essa incorporação aumenta a fluidez da MP e pode contribuir com a motilidade espermática (Connor et al., 1998). A adição de DHA ao sêmen suíno submetido à congelação resultou em maior motilidade, e os autores atribuíram à incorporação do DHA à membrana, auxiliando na transição de fase entre o estado líquido cristalino e o estado gel (Kaeoket et al., 2010). Em equinos, o uso de nutracêutico rico em DHA modificou a composição da MP dos espermatozoides, o que resultou em menor queda da motilidade no sêmen refrigerado por 48 horas, além disso, em garanhões com baixa motilidade pré-refrigeração (<40%), esse efeito foi observado às 24 horas de refrigeração. No entanto, neste experimento, a adição *in vitro* de DHA não resultou em melhora da motilidade. Vale ressaltar que os animais utilizados no presente experimento eram todos de fertilidade comprovada, o que pode explicar a ausência dos efeitos benéficos do α -Toh e do DHA sobre a motilidade espermática.

Tabela 2. Variáveis avaliadas no sêmen equino diluído (n = 20) acrescido de antioxidantes e submetido à refrigeração a 5°C por 72 horas

Variáveis	Tratamentos						
	C**	DHA	α-Toh	DHA/ α-Toh	EtOH 40	EtOH 100	EtOH 140
Mot (%)*	62,1 ± 16,2 ^{ab****}	62,2 ± 18,7 ^{ab}	65,0 ± 17,7 ^a	55,6 ± 18,7 ^c	65,75 ± 15,2 ^a	58,1 ± 8,6 ^{bc}	52,3 ± 20,1 ^c
Vigor (1-5)	3,4 ± 0,7 ^{ab}	3,4 ± 0,7 ^{ab}	3,4 ± 0,7 ^a	3,0 ± 0,6 ^{cd}	3,5 ± 0,6 ^a	3,2 ± 0,6 ^{bc}	2,8 ± 0,7 ^d
Ínt (%)	30,3 ± 13,0 ^a	27,2 ± 9,1 ^{abc}	28,6 ± 11,0 ^{ab}	26,4 ± 10,4 ^{abc}	28,3 ± 11,7 ^{ab}	25,9 ± 10,3 ^{bc}	23,4 ± 8,6 ^c
Frag (%)	4,6 ± 1,5 ^{ab}	4,3 ± 1,2 ^a	4,3 ± 1,3 ^a	4,1 ± 1,1 ^a	4,6 ± 1,3 ^{ab}	4,7 ± 1,3 ^{ab}	4,9 ± 1,4 ^b
DAB I (%)	16,3 ± 13,2	15,9 ± 12,7	16,4 ± 10,4	15,6 ± 13,0	14,1 ± 10,9	13,2 ± 12,4	14,3 ± 12,2
TBARS***	2.506,2 ± 796,4 ^b	2.036,0 ± 687,0 ^a	1.890,8 ± 749,5 ^a	1.821,1 ± 627,2 ^a	-	2.636,5 ± 1.100,3 ^b	2.599,6 ± 893,9 ^b

*Mot = Motilidade; Ínt = Íntegros; Frag = DNA fragmentado; DAB I = alta atividade mitocondrial de acordo com as classes do teste de 3,3'- diaminobenzidina; TBARS = Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

**C = Controle; DHA = ácido docosahexaenoico 10 ng/mL; α-Toh = α-tocoferol 2 µM; DHA/ α-Toh = associação entre ácido docosahexaenoico 10 ng/mL e α-tocoferol 2 µM; EtOH 40 = 40 µL de etanol, controle positivo do solvente do ácido docosahexaenoico; EtOH 100 = 100 µL de etanol, controle positivo do solvente do α-tocoferol; EtOH 140 = 140 µL de etanol, volume correspondente ao controle positivo do solvente do ácido docosahexaenoico e do α-tocoferol

***Unidade do TBARS = ng de malondialdeído / 10⁸ espermatozoides

****Letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre médias pelo teste de Duncan (p<0,05)

A associação entre DHA e α -Toh no sêmen bovino congelado resultou em aumento da motilidade e da viabilidade espermáticas (Nasiri et al., 2012; Towhidi e Parks, 2012), porém, neste experimento, essa combinação resultou em diminuição da motilidade e vigor. O mesmo fato foi observado no grupo controle positivo do etanol no volume correspondente à associação dos dois reagentes (EtOH 140), o que permite supor que o efeito tóxico do etanol superou o possível benefício que a associação entre a α -Toh e o DHA poderiam proporcionar à motilidade do sêmen submetido à refrigeração por 72 horas.

A adição de α -Toh, DHA ou a combinação dos dois compostos não foram eficazes em conferir maior proteção à MP. Ball et al. (2001) também não relataram maior proteção à integridade de membrana do sêmen equino acrescido de α -Toh após a refrigeração por 72 horas, porém no sêmen suíno foi observado aumento significativo da viabilidade espermática em amostras suplementadas com α -Toh e armazenadas a 19°C por cinco dias (Cerolini et al., 2000). A adição de DHA ao sêmen suíno congelado promoveu aumento da preservação da integridade de membrana (Kaeoket et al., 2010), porém o mesmo não foi observado no sêmen bovino quando o DHA foi utilizado isoladamente (Nasiri et al., 2012; Towhidi e Parks, 2012).

A refrigeração seminal aumenta a fragmentação do DNA (Linfor e Meyers, 2002), fato que foi observado no presente experimento entre 48 e 72 horas de armazenamento a 5°C. Porém, mesmo com o aumento da fragmentação, as médias encontradas em todos os momentos analisados enquadram-se na categoria dos animais com alta fertilidade segundo a classificação de Evenson e Jost (2000), em que os animais com menos de 15% de fragmentação do DNA são de alta fertilidade, e a de Love (2005) onde a média de fragmentação do DNA dos garanhões com alta fertilidade é de 12%. Em ambas as classificações o teste utilizado para avaliar a fragmentação do DNA foi o *acridine orange*, que possui correlação significativa ($r = 0,55$) com o teste do azul de toluidina (Naves et al., 2004) utilizado neste experimento.

O teste do DAB avalia a atividade mitocondrial através da quantificação do citocromo C presente na peça intermediária (Hrudka, 1987). Este teste não detectou diferença significativa entre os tratamentos, porém apresentou diminuição da classe DAB I em função do tempo, refletindo o gasto energético durante o armazenamento.

No sêmen congelado de garanhões, a adição de α -Toh não alterou a atividade mitocondrial (Baumber et al., 2005; Franco et al., 2013).

O α -Toh pode ser encontrado tanto no plasma seminal quanto na MP do espermatozoide (Agarwal et al., 2003) e tem a capacidade de neutralizar a reação em cadeia iniciada pela peroxidação lipídica, combatendo radicais peroxil e alcóxil (Wayner et al., 1987). Neste experimento, a adição de α -Toh ao diluidor de refrigeração do sêmen equino reduziu a peroxidação lipídica, confirmando os resultados obtidos por Almeida e Ball (2005) com sêmen refrigerado de garanhões, de Franco et al. (2013) com sêmen congelado de garanhões e de Cerolini et al. (2000) com sêmen suíno. O estresse oxidativo, além de aumentar a fragmentação do DNA (Agarwal e Said, 2003), pode alterar a fluidez da MP, resultando em decréscimo da motilidade e da viabilidade espermática, podendo, até mesmo, causar capacitação prematura do espermatozoide (Franco et al., 2013). No entanto, foi observada correlação entre a quantidade de ROS e fertilidade no sêmen fresco de equinos. Os autores consideram que o espermatozoide de garanhões tem como característica “viver rápido e morrer jovem”, gerando, assim maior nível de estresse oxidativo, porém, no sêmen submetido à preservação, o acúmulo de metabólitos no meio pode ser prejudicial ao espermatozoide (Gibb et al., 2014).

A adição de DHA ao sêmen equino causou um efeito inesperado quanto à peroxidação lipídica. O fato de este ácido graxo possuir seis duplas ligações o torna mais susceptível ao ataque das ROS, no entanto, foi observada uma diminuição dos valores de TBARS, que mede o nível de peroxidação lipídica. Além disso, não foi observada diferença entre os grupos suplementados com α -Toh, DHA e a associação entre α -Toh e DHA.

De fato, o DHA pode atuar como pró-oxidante ou como antioxidante (Yavin, 2006). Alguns testes envolvendo administração intra-amniótica de DHA, em ratos, mostram diminuição da peroxidação lipídica no sistema nervoso central dos neonatos tratados (Green et al., 2001a; Green et al., 2001b). O mecanismo pelo qual o DHA promove proteção antioxidante não está esclarecido, porém, os autores levantam algumas hipóteses sobre como esse PUFA poderia agir contra os efeitos nocivos das ROS: a) as ROS podem ter certa preferência por alguns PUFAs como, por exemplo, os n-6; b) quando o DHA é adicionado ao meio, sua incorporação à membrana plasmática se faz preferencialmente pela fosfatidiletanolamina (Stiwell e Wassall, 2003), fosfolípídeo que pode ser classificado como um plasmalogênio por

possuir uma ligação éter-vinílica no carbono 1 do glicerol. Os plasmalogênios podem apresentar alta atividade antioxidante e estão presentes em grandes concentrações nos espermatozoides (Sindelar et al., 1999) e; c) outro fosfolípídeo que possui grande afinidade pelo DHA é a fosfatidilserina e, quando se apresentam juntos, podem ter um efeito atrativo para os íons ferro, reduzindo sua atividade na reação de Fenton, diminuindo, então, a peroxidação lipídica (Yoshida et al., 1991; Green et al., 2001b).

A hipótese deste experimento de que a associação entre α -Toh e DHA pudesse melhorar as características seminais durante a refrigeração, através do aumento da fluidez da membrana proporcionada pela incorporação do DHA junto à proteção antioxidante do α -Toh, não se confirmou. Dois fatores podem estar relacionados à essa ausência de resposta: a utilização de garanhões com sêmen de alta qualidade e o efeito tóxico do etanol, utilizado como solvente do DHA e do α -Toh.

Desta forma, pode-se concluir que a adição de α -Toh e DHA diluído em etanol isoladamente não resultou em benefício para as variáveis seminais motilidade, vigor, fragmentação do DNA e atividade mitocondrial e, a associação desses compostos resultou em diminuição da motilidade e vigor do sêmen equino submetido à refrigeração por 72 horas. Além disso, foi observada diminuição dos níveis de peroxidação lipídica nos grupos tratados com α -Toh, DHA e a associação α -Toh/DHA, o que sugere que o DHA pode ter um efeito antioxidante paradoxal para o espermatozoide. Novas pesquisas devem ser realizadas buscando elucidar os efeitos do DHA sobre a fertilidade, sua utilização em animais que apresentam baixo potencial reprodutivo e o teste de outros solventes orgânicos para a diluição do DHA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, A., SAID, T.M. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. **Human Reproduction**, v.9, p.331-345, 2003.

AGARWAL, A., SALEH, R.A., BEDAIWY, M.A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and Sterility**, v.79, p.829-43, 2003.

AMANN, R.P., PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.7, p.145-173, 1987.

ALMEIDA, J., BALL, B.A. Effect of α -tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.87, p.321–337, 2005.

AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.65-75, 2005.

AURICH, C. Recent advances in cooled-semen technology. **Animal Reproduction Science**, v.107, p.268-275, 2008.

BALL, B.A., MEDINA, V. GRAVANCE, C.G., BAUMBER, J. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. **Theriogenology**, v.56, p.577-589, 2001.

BALL, B.A., VO, A. Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C- 11-BODIPY581/591. **Journal of Andrology**, v.23, p.259-269, 2002.

BALL, B.A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. **Animal Reproduction Science**, v.107, p. 257-267, 2008.

BAUMBER, J., BALL, B.A., LINFAR, J.J. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. **American Journal of Veterinary Research**, v.66, p.772-779, 2005.

BELETTI, M.E., COSTA, L.F., VIANA, M.P. A computational approach to characterization of bovine sperm chromatin alterations. **Biotechnic & Histochemistry**, v.79, , p.17-23, 2004.

CASTELLINI, C., LATTAIOLI, P., MORONI, M., MINELLI, A. Effect of seminal plasma on the characteristics and fertility of rabbit spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.63, p.275-282, 2000.

CEROLINI, S., MALDJIAN, A., SURAI, P., NOBLE, R. Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. **Animal Reproduction Science**, v.58, p.99-111, 2000.

CONNOR, W.E., LIN, D.S., WOLF, D.P., ALEXANDER, M. Uneven distribution of desmosterol and docosahexaenoic acid in the heads and tails of monkey sperm. **Journal of Lipids Research**, v.39, p.1404-1411, 1998.

EVENSON, D.P., JOST, L. Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. **Methods in Cell Science**, v.22, p.169-189, 2000.

FRANCO, J.S.V., CHAVEIRO, A., GÓIS, A., SILVA, F.M. Effects of α -tocopherol and ascorbic acid on equine semen quality after cryopreservation. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.33, p.787-793, 2013.

GAWRISCH, K., ELDHO, N.V., HOLTE, L.L. The structure of DHA in phospholipid membranes. **Lipids**, v.38, p.445-452, 2003.

GIBB, Z.; LAMBOURNE, S.R.; AITKEN, R.J. The paradoxical relationship between stallion fertility and oxidative stress. **Biology of Reproduction**, v.91, p.1-10, 2014.

GIRAUD, M.N., MOTTA, C., BOUCHER, D., GRIZARD, G. Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. **Human Reproduction**, v.15, p.2160-2164, 2000.

GREEN, P., GLOZMAN, S., YAVIN, E. Ethyl docosahexaenoate-associated decrease in fetal brain lipid peroxide production is mediated by activation of prostanoid and nitric oxide pathways. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1531, p.156-164, 2001a.

GREEN, P., GLOZMAN, S., WEINER, L., YAVIN, E. Enhanced free radical scavenging and decreased lipid peroxidation in the rat fetal brain after treatment with ethyl docosahexaenoate. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1532, p.203-212, 2001b.

HARRISON, R.A.P., VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, p.343-352, 1990.

HOWARD, A.C., McNEIL, A.K., McNEIL, P.L. Promotion of plasma membrane repair by vitamin E. **Nature Communications**, v.20, p.1-8, 2011.

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, p.809-828, 1987.

KAEOKET, K., SANG-URAI, P., THAMNIYOM, A., CHANAPIWAT, P., TECHAKUMPHU, M. Effect of docosahexaenoic acid on quality of cryopreserved boar semen in different breeds. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.458-463, 2010.

KESHTGAR, S., FANAEI, H., BAHMANPOUR, S., AZAD, F., GHANNADI, A., KAZERONI, M. *In vitro* effects of α -tocopherol on teratozoospermic semen samples. **Andrologia**, v.44, p.721-727, 2012.

LINFOR, J.J., MEYERS, S.A. Detection of DNA damage in response to cooling injury in equine spermatozoa using single-cell gel electrophoresis. **Journal of Andrology**, v.23, p.107-113, 2002.

LOVE, C.C. The sperm chromatin structure assay: a review of clinical applications. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.39-45, 2005.

NASIRI, A.H., TOWHIDI, A., ZEINOALDINI, S. Combined effect of DHA and α -tocopherol supplementation during bull semen cryopreservation on sperm characteristics and fatty acid composition. **Andrologia**, v.44, p.550–555, 2012.

NAVES, C.S., BELETTI, M.E., DUARTE, M.B., VIEIRA, R.C., DINIZ, E.G., JACOMINI, J.O. Avaliação da cromatina espermática em equinos com azul de toluidina e “acridine orange”. **Bioscience Journal**, v.20, p.117-124, 2004.

NEILL, A.R., MASTERS, C.J. Metabolism of fatty acids by bovine spermatozoa. **Biochemical Journal**, v.127, p.375-385, 1972.

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 epididymis stored at 4 and 34°C. **Theriogenology**, v.67, p.334–340, 2007.

NUNES, D.B.; ZORZATTO, J.R.; COSTA E SILVA, E.V.; ZÚCCARI, C.E.S.N. Efficiency of short-term storage of equine semen in a simple-design cooling system. **Animal Reproduction Science**, v.104, p.434-439, 2008.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 3.ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2007. 264p.

SANOCKA, D., KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.2, p.1-7, 2004.

SAS – Statistical Analysis System. SAS/STAT software, Version 8.02, Cary: 2001.

SINDELAR, P.J., GUAN, Z., DALLNER, G., ERNSTER, L. The protective role of plasmalogens in iron-induced lipid peroxidation. **Free Radical Biology & Medicine**, v.26, p.318-324, 1999.

STILLWELL, W., WASSALL, S.R. Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid. **Chemistry and Physics of Lipids**, v.126, p.1-27, 2003.

TAKAHASHI, T., ITOH, R., NISHINOMIYA, H., KATOH, M., MANABE, N. Effect of linoleic acid albumin in a dilution solution and long-term equilibration for freezing of bovine spermatozoa with poor freezability. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.92-97, 2012.

TOWHIDI, A., PARKS, J.E. Effect of n-3 fatty acids and α -tocopherol on post-thaw parameters and fatty acid composition of bovine sperm. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.29, p.1051–1056, 2012.

TRAN, K., WONG, J.T., LEE, E., CHAN, A.C., CHOY, P.C. Vitamin E potentiates arachidonate release and phospholipase A2 activity in rat heart myoblastic cells. **Biochemical Journal**, v.319, p.385–391, 1996.

WASSALL, S.R., STILLWELL, W. Polyunsaturated fatty acid cholesterol interactions: domain formation in membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1788, p.24–32, 2009.

WAYNER, D.D.M., BURTON, G.W., INGOLD, K.U., BARCLAY, L.R.C., LOCKE, S.J. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.924, p.408-419, 1987.

YAVIN, E. Docosahexaenoic acid: a pluripotent molecule acting as a membrane fluidizer, a cellular antioxidant and a modulator of gene expression. **Nutrition and Health**, v.18. p.261-262, 2006.

YOSHIDA, K., TERAOKA, J., SUZUKI, T., TAKAMA, K. Inhibitory effect of phosphatidylserine on iron-dependent lipid peroxidation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.179, p.1077-1081, 1991.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos conduzidos nesta tese de doutorado permitiram fazer a comparação de um antioxidante que ainda não havia sido testado em equinos, o AA2G, com a vitamina C e o α -tocoferol, que possuem eficácia comprovada contra a liperoxidação. Os resultados obtidos mostraram que o AA2G protege o espermatozoide equino contra a lipoperoxidação de maneira semelhante aos outros antioxidantes e, além disso, mostrou efeito positivo na motilidade e vigor espermático, com resultados superiores após o armazenamento a 5°C por 72 horas. No experimento realizado com DHA foi possível observar que esse ácido graxo poli-insaturado apresentou um efeito paradoxal, pois apesar de possuir seis insaturações, o que teoricamente aumentaria os níveis de lipoperoxidação, resultou em sua diminuição, com efeito antioxidante semelhante ao do α -tocoferol. Neste sentido, o AA2G e o DHA se apresentam como compostos promissores para inclusão nos meios diluidores do sêmen equino. Novos estudos devem ser conduzidos buscando o ajuste da concentração ideal, para testar os efeitos no sêmen congelado, avaliar a resposta no ejaculado de garanhões com baixo desempenho reprodutivo e se há interferência na fertilidade.