



**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS  
CURSO DE DOUTORADO**



# **ANTIOXIDANTES E OXIDANTES NA QUALIDADE DO ESPERMATOZOIDE EQUINO CRIOPRESERVADO**

**Bruno Gomes Nogueira**

Campo Grande – MS  
2019

**BRUNO GOMES NOGUEIRA**

**ANTIOXIDANTES E OXIDANTES NA QUALIDADE DO  
ESPERMATOZOIDE EQUINO CRIOPRESERVADO**

Antioxidants and Oxidants on cryopreserved equine spermatozoa  
quality

**BRUNO GOMES NOGUEIRA**

**Orientador: Profa. Dra. Maria Inês Lenz  
Souza**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Breno  
Fernandes Barreto Sampaio**

Tese apresentada à Universidade Federal de  
Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção  
do título de Doutor em Ciências Veterinárias.

CAMPO GRANDE, MS  
2019



Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**  
**Coordenadoria de Pós-Graduação (CPG/PROPP)**



**Ata de Defesa de Tese**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias**  
**Doutorado**

Aos quatro dias do mês de outubro do ano de dois mil e dezenove, às treze horas e trinta minutos, na Sala F da Pós-Graduação, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Maria Ines Lenz Souza (UFMS), Carmem Estefania Serra Neto Zuccari, Eliane Vianna da Costa e Silva (UFMS), Gustavo Guerino Macedo (UFMS) e Joice Stein (UFMS), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho do aluno: **BRUNO GOMES NOGUEIRA**, CPF 10649011740, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Curso de Doutorado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "**ANTIOXIDANTES E OXIDANTES NA QUALIDADE DO ESPERMATOZÓIDE EQUINO CRIOPRESERVADO**" e orientação de Maria Ines Lenz Souza. A presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra ao aluno que expôs sua Tese. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, a presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR	ASSINATURA	AVALIAÇÃO
Dra. Maria Ines Lenz Souza (Interno)		Aprovado
Dr. Carlos Eurico dos Santos Fernandes (Externo) (Suplente)		Aprovado
Dra. Carmem Estefania Serra Neto Zuccari (Externo)		Aprovado
Dra. Eliane Vianna da Costa e Silva (Interno)		Aprovado
Dr. Gustavo Guerino Macedo (Interno)		Aprovado
Dra. Joice Stein (Externo)		Aprovado
Dr. Marcelo George Mungai Chacur (Interno) (Suplente)		Aprovado

**RESULTADO FINAL:**

Aprovação       Aprovação com revisão       Reprovação

**OBSERVAÇÕES:**

O CANDIDATO DEVE ACATAR AS CORREÇÕES SUGERIDAS PELA BANCA EXAMINADORA

Nada mais havendo a ser tratado, a Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Assinaturas:

Presidente da Banca Examinadora

Aluno

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela existência da vida, me dando saúde e fé para poder chegar até aqui.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), pela oportunidade de realizar o curso de Doutorado em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Inês Lenz Souza, pela amizade, apoio, correções, orientações, pelas horas de conversa e por sempre confiar em mim na execução deste trabalho.

Ao meu amigo e Co-orientador Prof. Dr. Breno Fernandes Barreto Sampaio, por toda ajuda disponibilizada em todos os momentos deste trabalho. Sempre esteve disponível e presente, me ajudando e incentivando a cada nova etapa.

À Profa. Dra. Carmem Estefânia Serra Neto Zúccari, por todo ensinamento transmitido desde a época do Mestrado, e que formou a base para execução deste Doutorado, e por aceitar fazer parte das bancas.

À Profa. Dra. Eliane Vianna Costa e Silva, pela amizade, participação nas minhas bancas, correções e sugestões.

Ao Prof. Dr. Gustavo Guerino Macedo e Profa. Dra. Joice Stein por aceitarem participar da banca final e assim contribuir para o crescimento deste trabalho.

Ao amigo, Prof. Dr. Júlio César Ferraz Jacob, que me deu os primeiros ensinamentos na área de reprodução equina.

À toda equipe do Laboratório Multiuso de Reprodução Animal, especialmente, aos Médicos Veterinários, Bruno Milan, Willian Vaniel, Mozart, Raiza Pereira e à Farmacêutica, Bianca Rodriguez, pela ajuda no desenvolvimento da parte prática do experimento.

Aos colegas, Médicos Veterinários, Daniela Brandão, Gustavo, Rodrigo (Magrão), Fábio Andrey (Fabão), pela ajuda prestada na parte prática do experimento.

À minha esposa Julia, pela compreensão, fundamental nestes anos, por estar sempre ao meu lado me apoiando, incentivando e ajudando a conquistar meus sonhos. Obrigado por existir na minha vida.

Ao meu filho Breno, tão amado, que mesmo tão pequeno, foi maduro o suficiente para entender meus momentos de ausência, necessários para a realização deste trabalho.

Aos meus pais, João e Célia, e ao meu irmão, Bernardo, que sempre me apoiaram e vibraram a cada vitória, estimulando-me a sempre seguir em frente, transmitindo paz e segurança nos momentos de dificuldade.

À minha tia “Mama” (*in memoriam*) e aos meus primos, Fred e Rodrigo, por todo incentivo e amor prestados ao longo da minha vida.

A todos os familiares que contribuíram para que este momento fosse possível.

Aos meus sogros, Maninho e Giselda, que sempre acreditaram em mim, incentivando e dando o auxílio necessário para o meu crescimento.

À “Vó” Armanda e “Tia” Manoela por todo carinho, apoio e confiança.

---

**SUMÁRIO**

---

<b>RESUMO.....</b>	<b>10</b>
<b>CAPÍTULO 1.....</b>	<b>13</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 Objetivos Gerais.....</b>	<b>14</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos.....</b>	<b>14</b>
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1. Criopreservação do Sêmen Equino.....</b>	<b>15</b>
<b>3.2. Metabolismo Espermático.....</b>	<b>17</b>
<b>3.3. Radicais Livres.....</b>	<b>19</b>
<b>3.4. Espécies Reativas de Oxigênio.....</b>	<b>19</b>
<b>3.4.1 Ânion superóxido.....</b>	<b>20</b>
<b>3.4.2 Peróxido de hidrogênio.....</b>	<b>21</b>
<b>3.4.3 Radical hidroxila.....</b>	<b>21</b>
<b>3.5. Função Espermática vs Espécies Reativas de Oxigênio.....</b>	<b>21</b>
<b>3.6. Peroxidação Lipídica.....</b>	<b>23</b>
<b>3.7. Sistema de Defesa Antioxidante.....</b>	<b>25</b>
<b>3.7.1 Antioxidantes Não Enzimáticos.....</b>	<b>26</b>
<b>3.7.1.1 Melatonina.....</b>	<b>26</b>
<b>3.7.1.2 Coenzima Q10.....</b>	<b>27</b>
<b>3.8. Oxidantes e Estresse Sub-letal.....</b>	<b>32</b>
<b>3.9. Citometria de Fluxo.....</b>	<b>33</b>
<b>3.9.1 Fluorocromos e citometria de fluxo.....</b>	<b>34</b>
<b>4. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>37</b>
<b>CAPÍTULO 2 Coenzima Q10 e Melatonina protegem o espermatozoide equino criopreservado contra a lipoperoxidação.....</b>	<b>49</b>

<b>Resumo</b> .....	49
<b>Abstract</b> .....	50
<b>Introdução</b> .....	52
<b>Materiais e Métodos</b> .....	54
<b>Resultados</b> .....	58
<b>Discussão</b> .....	63
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	71
<b>CAPÍTULO 3 Ozônio preserva a integridade das membranas plasmática e acrossomal na criopreservação do sêmen equino</b> .....	78
<b>Resumo</b> .....	78
<b>Abstract</b> .....	79
<b>Introdução</b> .....	80
<b>Materiais e Métodos</b> .....	81
<b>Resultados</b> .....	85
<b>Discussão</b> .....	91
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	96
<b>ANEXOS</b> .....	101
<b>Projeto Aprovado</b> .....	101
<b>Autorizações Legais</b> .....	102
<b>Normas das Revistas</b> .....	103

---

---

**LISTA DE TABELAS**

---

Tabela 1. Valores médios ( $\pm$ erro padrão) das variáveis espermáticas pós-descongelamento do sêmen equino com antioxidantes não enzimáticos isolados ou em associação, Campo Grande, MS.....	60
Tabela 2. Valores médios ( $\pm$ erro padrão) das variáveis espermáticas pós-descongelamento e pós-incubação por 30 minutos a 37°C do sêmen equino com antioxidantes não enzimáticos isolados ou em associação, Campo Grande, MS.....	61
Tabela 3. Valores médios ( $\pm$ erro padrão) das variáveis espermáticas pós-descongelamento e pós-incubação por 60 minutos a 37°C do sêmen equino com antioxidantes não enzimáticos isolados ou em associação, Campo Grande, MS.....	62
Tabela 4. Valores médios ( $\pm$ erro padrão) das variáveis espermáticas pós-descongelamento do sêmen equino com diferentes concentrações de ozônio, Campo Grande, MS.....	88
Tabela 5. Valores médios ( $\pm$ erro padrão) das variáveis espermáticas pós-descongelamento e pós-incubação por 30 minutos a 37°C do sêmen equino com diferentes concentrações de ozônio, Campo Grande, MS.....	89
Tabela 6. Valores médios ( $\pm$ erro padrão) das variáveis espermáticas pós-descongelamento e pós-incubação por 60 minutos a 37°C do sêmen equino com diferentes concentrações de ozônio, Campo Grande, MS.....	90

---

**LISTA DE FIGURAS**

---

Figura 1. Compartimentalização sub-celular da fosforilação oxidativa (OXPHOS) e glicólise no espermatozoide.....	18
Figura 2. Redução tetravalente do oxigênio molecular que ocorre na mitocôndria....	20
Figura 3. Reação de dissociação do ozônio em fluidos biológicos.....	33

## RESUMO

**NOGUEIRA, B.G. Antioxidantes e oxidantes na qualidade do espermatozoide equino criopreservado. 2019. 103p. Tese de Doutorado –Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2019.**

A criopreservação do sêmen equino é uma biotécnica de grande valor para a equideocultura. Contudo, tal procedimento está relacionado com o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), estresse oxidativo e redução da fertilidade do sêmen criopreservado. Neste contexto, as pesquisas são direcionadas para a adição de diferentes antioxidantes na tentativa de redução dos efeitos nocivos ocasionados pelo estresse oxidativo. Por outro lado, a aplicação de estressores, de forma controlada, em doses sub-letais, pode ativar uma resposta temporária em células espermáticas. Desta forma, num primeiro experimento, objetivou-se estudar o sêmen equino frente à suplementação com substâncias antioxidantes, coenzima Q10 (CoQ10) e melatonina (MEL), e suas respostas em qualidade seminal, ao longo do processo de criopreservação, bem como, verificar seus possíveis efeitos protetores durante incubação por 60 minutos a 37°C. Foram colhidas 20 amostras de sêmen, oriundas de cinco garanhões de fertilidade comprovada. Distribuiu-se os ejaculados em seis grupos: controle (sem adição de antioxidantes), melatonina 0,75 mM (MEL1), melatonina 1,5 mM (MEL2), coenzima Q10 40 µg/mL (Q1), coenzima Q10 200 µg/mL (Q2), e, a associação das menores concentrações de ambas as substâncias, melatonina 0,75 mM + coenzima Q10 40 µg/mL (MEL1 + Q1). As análises laboratoriais foram efetuadas pós-colheita, e após a descongelação, nos momentos, m-0 - pós-descongelação; m-30 - após 30 minutos e m-60 - após 60 minutos de incubação a 37°C, avaliando-se as seguintes variáveis espermáticas: cinética espermática, pelo sistema computadorizado (Sperm Class Analyzer – SCA), e, integridade de membrana plasmática e acrossomal, capacitação espermática, potencial de membrana mitocondrial e suscetibilidade à lipoperoxidação (LPO), por citometria de fluxo. O grupo Q2 preservou o maior percentual de células com motilidade total e progressiva após 60 minutos de incubação pós-descongelação, quando comparado ao grupo controle ( $30,2 \pm 2,5\%$  e  $19,4 \pm 2,1\%$  vs  $21,3 \pm 2,2\%$  e  $13,5 \pm 2,1\%$ ;  $p < 0,05$ ). A CoQ10, em ambas as concentrações testadas, resultou maior percentual de espermatozoides com membrana plasmática íntegra apresentando alto potencial de membrana mitocondrial, após 30 e 60 minutos de incubação, quando comparado ao grupo controle (Q1 -  $64,8 \pm 9,9\%$ , Q2 -  $65,2 \pm 10,5\%$  vs  $55,1 \pm 10,0\%$  - M-30 e Q1 -  $63,3 \pm 10,4\%$ , Q2 -  $64,6 \pm 10,8\%$  vs  $53,1 \pm 10,6\%$  - M-60;  $p < 0,05$ ). A melatonina conferiu maior estabilidade de membrana (não capacitados) em todos os momentos avaliados, comparando-se ao grupo controle (MEL1 -  $42,1 \pm 6,0\%$ , MEL2 -  $44,0 \pm 6,7\%$  vs  $35,9 \pm 5,9\%$  - M-0; MEL1 -  $40,8 \pm 5,6\%$ , MEL2 -  $42,6 \pm 7,2\%$  vs  $33,1 \pm 6,6\%$  - M-30 e MEL1 -  $37,5 \pm 7,4\%$ , MEL2 -  $39,1 \pm 7,2\%$  vs  $31,3 \pm 6,5\%$  - M-60;  $p < 0,05$ ). Os antioxidantes utilizados, isolados, ou em associação, resultaram em menores níveis de LPO em todos os momentos avaliados, comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). CoQ10 e melatonina foram eficazes na criopreservação do sêmen equino, ao promover maior percentual de espermatozoides com motilidade total e progressiva, com alto potencial de membrana mitocondrial e não capacitados ao longo do processo de congelamento/descongelamento, bem como, após 60 minutos de incubação *in vitro* a 37°C. Num segundo experimento, o objetivo foi identificar a dose sub-letal de estresse oxidativo e o efeito do mesmo, através da utilização do ozônio, na manutenção das variáveis espermáticas, e a eficácia do mesmo na prevenção da LPO do sêmen equino, ao longo do processo de criopreservação e durante incubação por 60 minutos a 37°C, pós-descongelamento. Os ejaculados foram submetidos aos seguintes tratamentos: Controle (sem adição de antioxidantes), ozônio 2 µg/mL (O<sub>3</sub>-2), ozônio 15 µg/mL (O<sub>3</sub>-15), ozônio 30 µg/mL (O<sub>3</sub>-30), ozônio 61 µg/mL (O<sub>3</sub>-61). O grupo O<sub>3</sub>-15 preservou o maior percentual de espermatozoides com motilidade progressiva pós-descongelamento, sendo significativamente superior aos demais grupos ( $p < 0,05$ ), exceto quando comparado ao grupo O<sub>3</sub>-2 ( $p > 0,05$ ). O maior percentual de espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal íntegras foi obtido pelo grupo O<sub>3</sub>-2 em todos os momentos avaliados, sendo significativamente superior aos demais tratamentos ( $p < 0,05$ ).

Conclui-se que o ozônio pode trazer benefícios à criopreservação do sêmen equino em dose dependente, ao promover maior percentual de células com motilidade progressiva e com integridade de membranas plasmática e acrossomal.

Palavras-chave: Coenzima Q10, Estresse Oxidativo, Melatonina, Ozônio, Peroxidação Lipídica, ROS

## ABSTRACT

**NOGUEIRA, B.G. Antioxidants and oxidants on cryopreserved equine spermatozoa quality. 2019. 103p. Tese de Doutorado –Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2019.**

Equine's semen cryopreservation is a biotechnology of great value for equine industry. However, this procedure is related to increased generation of reactive oxygen species (ROS), oxidative stress and reduced fertility. In this context, research is directed to different antioxidants addition to reduce the harmful oxidative stress effects. On the other hand, the controlled application of stressors at sublethal doses may activate a temporary response in sperm cells. In a first experiment, the objective was to study equine semen against supplementation with antioxidant substances, coenzyme Q10 (CoQ10) and melatonin (MEL), and their responses in seminal quality throughout the cryopreservation process, as well as to verify possible protective effects during incubation for 60 minutes at 37°C. Twenty semen samples were collected from five stallions of proven fertility. The ejaculates were distributed into six groups: control (no antioxidant added), 0.75 mM melatonin (MEL1), 1.5 mM melatonin (MEL2), coenzyme Q10 40 µg/mL (Q1), coenzyme Q10 200 µg/mL (Q2), and the association of the lowest concentrations of both substances, 0.75 mM melatonin + coenzyme Q10 40 µg/mL (MEL1 + Q1). Laboratory analyzes were performed post-collection, and after thawing, at times, m-0 - post-thawing; m-30 - after 30 minutes and m-60 - after 60 minutes of incubation at 37°C, evaluating the following sperm variables: sperm kinetics, by computer system (Sperm Class Analyzer - SCA), and plasma and acrosomal membrane integrity, sperm capacitation, mitochondrial membrane potential and susceptibility to lipoperoxidation by flow cytometry. Q2 group preserved the highest percentage of cells with total and progressive motility after 60 minutes of incubation after thawing when compared to the control group (30.2 ± 2.5% and 19.4 ± 2.1% vs 21.3 ± 2.2% and 13.5 ± 2.1%; p<0.05). CoQ10 at both concentrations tested showed a higher percentage of sperm intact plasmatic membrane with high mitochondrial membrane potential after 30 and 60 minutes of incubation when compared to the control group (Q1 - 64.8 ± 9.9%, Q2 - 65.2 ± 10.5% vs 55.1 ± 10.0% - M-30 and Q1 - 63.3 ± 10.4%, Q2 - 64.6 ± 10.8% vs 53.1 ± 10.6% - M-60; p<0.05). Melatonin conferred greater membrane stability (non-capacitated) at all moments evaluated compared to control group. (MEL1 - 42.1 ± 6.0%, MEL2 - 44.0 ± 6.7% vs 35.9 ± 5.9% - M-0, MEL1 - 40.8 ± 5.6%, MEL2 - 42.6 ± 7.2% vs 33.1 ± 6.6% - M-30 and MEL1 - 37.5 ± 7.4%, MEL2 - 39.1 ± 7.2% vs 31.3 ± 6.5% - M-60; p<0.05). The antioxidants used, alone or in association, resulted in lower lipid peroxidation levels at all moments, compared to control group (p<0.05). It can be concluded that CoQ10 and melatonin are effective in equine semen cryopreservation by promoting higher percentage of total and progressive motility sperm with high mitochondrial membrane potential and greater membrane stability (non-capacitated) throughout the freezing/thawing process, as well as, after 60 minutes of in vitro incubation at 37°C. In a second experiment, the objective was to identify the sublethal dose of oxidative stress and its effect through the use of ozone in the maintenance of sperm variables and its effectiveness in preventing equine semen LPO, throughout cryopreservation process and during incubation for 60 minutes at 37°C, after thawing. The ejaculates were subjected to the following treatments: Control (no antioxidant added), 2 µg/mL ozone (O3-2), 15 µg/mL ozone (O3-15), 30 µg/mL ozone (O3-30), ozone 61 µg/ml (O3-61). O3-15 group preserved the highest percentage of sperm with progressive motility after thawing, being significantly higher than the other groups (p<0.05), except when compared to group O3-2 (p>0.05). The highest percentage of sperm with intact plasma and acrosomal membranes was always obtained by O3-2 group, being significantly higher than the other treatments (p<0.05). It is concluded that ozone may bring benefits to equine semen cryopreservation in a dose-dependent manner, by promoting a higher percentage of cells with progressive motility and integrity of plasma and acrosomal membranes.

Keywords: Coenzyme Q10, Lipid Peroxidation, Melatonin, Oxidative Stress, Ozone, ROS

## CAPÍTULO 1

### 1. INTRODUÇÃO

O metabolismo aeróbico está associado com a geração de moléculas pró-oxidantes, denominadas radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (ROS), comumente encontradas no plasma seminal. As ROS podem desempenhar funções fisiológicas ou deletérias ao sêmen, de acordo com as suas concentrações. A homeostase intracelular é mantida através de um sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático (Agarwal et al., 2006; Saalu, 2010).

Quando em concentrações fisiológicas, as ROS participam de processos vitais dos espermatozoides como maturação, capacitação e hiperativação espermáticas, reação acrossomal e fusão espermo-oocitária. Porém, sob condições patológicas, induzem ao processo de lipoperoxidação (LPO), danos ao DNA e apoptose dos gametas (Kothari et al., 2010).

A LPO ocorre como consequência do estresse oxidativo, um processo que se dá quando as ROS sobrecarregam o sistema antioxidante de defesa, podendo comprometer a fertilidade do sêmen (Agarwal et al., 2006). O espermatozoide de mamíferos é altamente sensível aos efeitos da LPO, devido à alta concentração de lipídeos poli-insaturados (PUFAs) na composição de sua membrana plasmática (Sanocka e Kurpisz, 2004).

Os antioxidantes têm a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pelas ROS. O espermatozoide possui uma linha de defesa celular deficiente, devido à escassez de citoplasma. No entanto, o plasma seminal confere maior proteção devido à alta concentração e variedade de antioxidantes presentes em sua composição (Maia e Bicudo, 2009; Barbosa et al., 2010).

Com o avanço das biotecnologias da reprodução, busca-se, cada vez mais, a melhoria da qualidade dos processos de conservação do material genético visando aumentar a eficiência dessas técnicas. Assim, estudos vêm acrescentando antioxidantes aos meios diluidores na tentativa de neutralizar os efeitos nocivos das ROS (Nogueira et al., 2015; Izadpanah et al., 2015;

Yousefian et al., 2015; Carneiro et al., 2018; Lançoni et al., 2018), uma vez que a manipulação, o armazenamento, a refrigeração e a congelação do sêmen resultam em aumento dos níveis de ROS (Aurich et al., 2007).

A presente revisão tem por objetivo abordar aspectos relacionados à criopreservação do sêmen equino, os mecanismos envolvidos na produção de ROS, seus efeitos benéficos e deletérios ao sêmen de mamíferos, assim como os mecanismos antioxidantes de defesa celular envolvidos no processo.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos Gerais**

Adicionar ao diluente de congelação antioxidantes não enzimáticos, visando à redução das crioinjúrias causadas ao sêmen de garanhões.

Testar diferentes concentrações de ozônio no diluente de congelação, visando uma dose controlada e sub-letal de estresse oxidativo, a fim de potencializar o sistema de defesa antioxidante e redução das crioinjúrias causadas ao sêmen de garanhões ao longo do processo de criopreservação.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Determinar o efeito da adição de melatonina e coenzima Q10, isoladamente e em associação, ao diluente de congelação, durante o processo de congelação/descongelação, sobre os parâmetros de cinética espermática, integridade de membrana plasmática e do acrossoma, capacitação espermática, atividade mitocondrial e susceptibilidade à lipoperoxidação.

Avaliar o possível efeito protetor das substâncias adicionadas, na prevenção da peroxidação lipídica, bem como na manutenção das características espermáticas, durante incubação *in vitro* por 60 minutos.

Avaliar o possível efeito protetor do estresse sub-letal, induzido através do ozônio, na manutenção das características espermáticas, tanto ao longo da congelação/descongelação do sêmen de garanhões, quanto aos 60 minutos de incubação *in vitro*.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Criopreservação do Sêmen Equino

A inseminação artificial (IA) é amplamente utilizada no sistema de produção animal e oferece inúmeras vantagens sobre a monta natural, tais como melhor aproveitamento de garanhões geneticamente superiores, diminuição dos acidentes durante a cobertura e redução dos riscos de transmissão de doenças venéreas (Brinsko et al., 2011). Contudo, o sêmen *in natura*, somente se mantém viável por algum tempo após a colheita. Para aumentar sua longevidade, faz-se necessária a utilização de diluidores, seja para refrigeração ou congelação (Sieme et al., 2015).

A aplicação prática da IA, através do uso de sêmen refrigerado, já é rotina em um número expressivo de haras, podendo a célula espermática sobreviver por um período de até 48 horas (Newcombe e Cuervo-Arango, 2011); por outro lado, o sêmen congelado ainda é pouco utilizado, devido aos baixos percentuais de fertilidade atingidos (Cerny et al., 2012).

A criopreservação do sêmen é uma biotecnologia que proporciona grandes vantagens, dentre elas o armazenamento do material genético por tempo indeterminado e a utilização deste em situações de infertilidade adquirida, enfermidades outras e óbito do garanhão. Porém, as células espermáticas são expostas a condições extremamente desfavoráveis, afetando muitas de suas características, tais como a motilidade, a atividade respiratória, o *status* da membrana celular e a qualidade do DNA, conseqüentemente reduzindo a viabilidade, inibindo o transporte no sistema genital feminino, alterando o momento da fertilização e, finalmente, afetando o desenvolvimento embrionário (Gillan et al., 2004; Bustamante Filho, 2006).

Os diluentes de congelação são, normalmente, compostos de leite desnatado, glicerol, como principal crioprotetor, açúcares e gema de ovo (Amann e Pickett, 1987). Agentes crioprotetores podem ser classificados como permeáveis ou intracelulares e impermeáveis ou extracelulares. Os permeáveis atuam através de sua capacidade de se ligar à água ou às suas propriedades coligativas, e atravessam a membrana plasmática (MP), modulando a taxa e o

conteúdo da desidratação celular, durante a transição de fase da membrana plasmática induzida pela congelação. Os crioprotetores não permeáveis são caracterizados por pequenas moléculas osmoticamente ativas e macromoléculas osmoticamente inativas (Sieme et al., 2016), e protegem os espermatozoides, através da criação de um ambiente extracelular hipertônico, que induz o movimento da água para fora das células, desidratando-as e reduzindo as chances de formação de cristais de gelo (Alvarenga et al., 2016).

A refrigeração, etapa pertinente ao processo de criopreservação, altera estruturas e conformação de biomoléculas da MP e, quando não realizada adequadamente, resulta em lesões na membrana, com conseqüente queda de motilidade e fertilidade (Squires et al., 1999). Em relação à taxa de refrigeração, Kayser et al. (1992) relataram que o sêmen equino pode ser refrigerado rapidamente de 37 a 20°C, mas, entre 20 a 5°C, deve-se obedecer a uma curva lenta de refrigeração, menor que -0,1°C/min. De fato, nesta faixa de temperatura, ocorre a transição de fase dos lipídeos da MP, que passam do estado líquido-cristalino para gel (Squires et al., 1999), e uma curva de refrigeração lenta neste período pode reduzir os danos causados à MP, relacionados ao choque térmico pelo frio. Squires et al. (1999) indicam que esta fase crítica ocorre entre 19 e 8°C, momento em que a taxa de refrigeração deve ser de -0,05°C/min, desta forma favorecendo a reorganização dos lipídeos da MP.

Durante a congelação, o espermatozoide é exposto a temperaturas abaixo de 0°C, quando se inicia a formação extracelular de cristais de gelo, gerando um aumento na concentração de sais neste ambiente (Amann e Pickett, 1987), o que resulta em ambiente hipertônico para a célula espermática. Tal fato, leva à desidratação espermática, na tentativa de manter o equilíbrio na concentração de solutos entre os meios intra e extracelulares (Sieme et al., 2015). A taxa de desidratação varia conforme a velocidade da refrigeração, sendo a lenta considerada a ideal, evitando que se formem, em excesso, cristais de gelo no meio intracelular, o que levaria à morte celular. Já na descongelação, ocorre o processo inverso, o espermatozoide é exposto às condições hipotônicas, resultando em absorção de água e edema da célula (Amann e Pickett, 1987;

Sieme et al., 2015; Sieme et al., 2016). Segundo Peña et al. (2015), a mitocôndria é mais sensível ao choque osmótico do que a MP.

Ao longo do processo de criopreservação do sêmen, ocorre aumento na produção de ROS, sendo a mitocôndria a principal fonte geradora destas substâncias, através da cadeia de transporte de elétrons (Green et al., 2004). O espermatozoide criopreservado apresenta uma senescência prematura, e estudos apontam que as mitocôndrias são extremamente sensíveis ao processo, e seu comprometimento funcional resulta em aumento na geração de ROS (Ortega-Ferrusola et al., 2009; Peña et al., 2015). Tal fato seria a principal causa do estresse oxidativo nas membranas espermáticas, associado ao esgotamento do sistema antioxidante de defesa, pela remoção de grande parte do plasma seminal, o que leva a uma redução na fertilidade (Büyükleblebici et al., 2014).

### **3.2 Metabolismo Espermático**

Espermatozoides são células altamente especializadas, cujo objetivo único é fertilizar um ovócito. Para tanto, necessitam de um efetivo processo metabólico para geração de energia através de ATP, motilidade progressiva, proteínas necessárias para a sobrevivência no trato reprodutivo feminino, enzimas para a penetração pelas estruturas externas do ovócito e distribuição adequada de lipídeos e proteínas na composição da MP (Squires et al., 1999). Além disso, esta célula ainda precisa passar por processos fisiológicos como capacitação, hiperativação, reação acrossomal e fusão espermato-ovocitária, os quais requerem uma alta demanda energética (Flesch e Gadella, 2000).

As mitocôndrias são organelas celulares responsáveis pela produção de ATP e, no espermatozoide, estão localizadas exclusivamente na peça intermediária (Peña et al., 2009). As principais vias metabólicas para a síntese de energia são a glicólise e a fosforilação oxidativa (OXPHOS). Tais vias podem variar quanto a sua importância, bem como sua localização nas diferentes espécies de mamíferos. Enquanto a OXPHOS ocorre exclusivamente na mitocôndria, a glicólise acontece nas fibras externas densas do flagelo, local onde se encontram as enzimas glicolíticas (Ferramosca e Zara, 2014). Sugere-se que o espermatozoide equino seja extremamente dependente da OXPHOS

(Varner et al., 2014). Gibb et al. (2014) ratificaram esta informação ao exporem espermatozoides equino e humano à presença de um inibidor mitocondrial (difeníl-eneiodônio – DPI). As células da espécie equina tiveram uma redução significativa da velocidade espermática ( $p < 0,01$ ) e dos níveis de ATP ( $p < 0,05$ ), fato não observado na amostra humana.

A OXPHOS ocorre, mais precisamente, nas cristas da membrana mitocondrial interna, através da cadeia de transporte de elétrons, onde moléculas de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e flavina-adenina dinucleotídeo ( $FADH_2$ ), oriundas do ciclo de Krebs e da glicólise, doam elétrons para a primeira proteína mitocondrial, denominada de complexo I. Estes elétrons percorrem toda a crista através dos complexos II, III, IV e da coenzima Q (ubiquinona) (Figura 1) e, ao final, estes são transferidos para uma molécula de oxigênio ( $O_2$ ), formando a primeira ROS, o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) (Green et al., 2004; Ferramosca e Zara, 2014). Durante este transporte, prótons de hidrogênio ( $H^+$ ) migram da área interna mitocondrial para o espaço inter-membranas. Ao final da cadeia, estes prótons geram energia e passam através do complexo V ou ATP sintase, originando uma molécula de ATP.

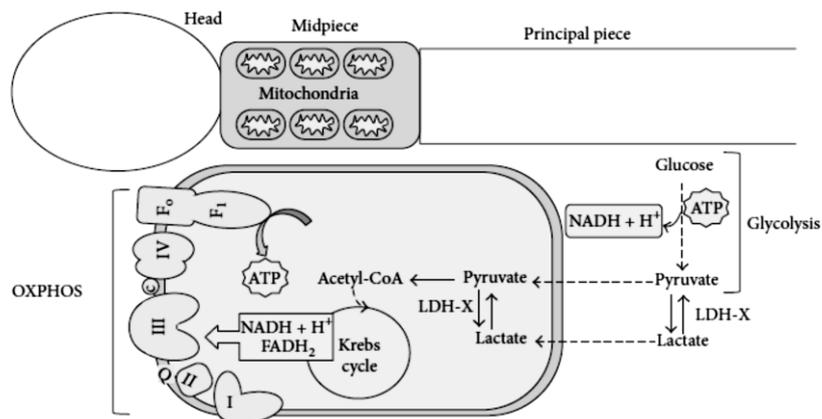


Figura 1. Compartimentalização sub-celular da fosforilação oxidativa (OXPHOS) e glicólise no espermatozoide. O sistema da OXPHOS é composto por cinco complexos. Transporte de elétron do complexo I ao IV é acompanhado por síntese de ATP. Moléculas redutoras (NADH e  $FADH_2$ ) produzidas pelas reações do ciclo de Krebs e glicólise são transferidas para a cadeia de transporte de elétrons da membrana mitocondrial interna. c - citocromo C; Q - ubiquinona. Fonte: Ferramosca e Zara (2014)

### 3.3 Radicais Livres

Os radicais livres podem ser definidos quimicamente como qualquer íon, átomo ou molécula que apresente um ou mais elétrons desemparelhados, ou seja, um número ímpar de elétrons em sua última camada. São altamente instáveis e reativos, tendendo a se ligar a outro elétron com a finalidade de alcançar a estabilidade (Ferreira e Matsubara, 1997; Souza e Ferreira, 2007). Desta forma, podem reagir facilmente com a maioria das biomoléculas, começando uma reação em cadeia de formação de radicais livres (Nordberg e Arnér, 2001).

Estes compostos são formados em reações de óxido-redução, seja cedendo um elétron e tornando-se oxidado, ou recebendo outro e ficando na forma reduzida (Ferreira e Matsubara, 1997). Sies (1997) indica as radiações X, ultravioleta, ultrassônicas e por micro-ondas como fontes geradoras de radicais livres.

A geração de radicais livres ocorre, normalmente, nas mitocôndrias, membranas celulares e citoplasma (Barbosa et al., 2010), e pode ser favorecida pela presença de íons ferro e cobre (Koury e Donangelo, 2003), mas a principal fonte geradora de radicais livres é a mitocôndria, por meio da cadeia de transporte de elétrons (Green et al., 2004). Os radicais livres têm efeitos deletérios sobre as células e estão, geralmente, associados às patologias e morte celular (Souza e Ferreira, 2007).

Segundo Ferreira e Matsubara (1997), na maioria das vezes os radicais livres são oriundos do metabolismo do oxigênio e, portanto, denominados de espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ERMO), sendo mais comumente intitulados como ROS.

### 3.4 Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

As ROS são formadas e degradadas por todos os organismos aeróbicos, sendo necessárias para o funcionamento celular normal, quando se encontram em concentrações fisiológicas. Por outro lado, quando em excesso, são prejudiciais e geram o estresse oxidativo (Nordberg e Arnér, 2001). Portanto, o

funcionamento ideal do sistema aeróbico depende de um equilíbrio gerado entre as quantidades de ROS produzidas e removidas pelo sistema antioxidante celular (Halliwell e Gutteridge, 1999; Maia e Bicudo, 2009).

São considerados como ROS todos os radicais e não radicais derivados do oxigênio. Devido à sua instabilidade e alta reatividade eletrônica, podem reagir com um grande número de compostos adjacentes, atuando como receptores ou doadores de elétrons (Agarwal et al., 2005; Andrade et al., 2010).

Segundo Ferreira e Matsubara (1997), Halliwell e Gutteridge (1999) e Nordberg e Arnér (2001), sob as condições normais do metabolismo celular aeróbico, o oxigênio molecular ( $O_2$ ) sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água (Figura 2). Barbosa et al. (2010) complementam que esta redução ocorre na mitocôndria, sendo catalisada pela enzima citocromo oxidase.

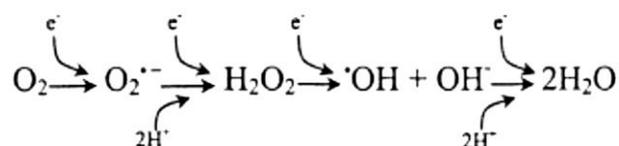


Figura 2. Redução tetravalente do oxigênio molecular que ocorre na mitocôndria. Fonte: Nordberg e Arnér (2001)

Durante o processo de redução do oxigênio molecular são formados intermediários reativos como os radicais superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e hidroxila ( $\cdot OH$ ), além do não radical peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ; Maia e Bicudo, 2009).

### 3.4.1 Ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ )

O ânion superóxido é gerado, principalmente, na membrana mitocondrial de forma espontânea, através da cadeia respiratória. Parece ser o produto primário do sistema de formação de ROS. É um radical livre pouco reativo, formado após a primeira redução do oxigênio molecular, pela adição de um elétron. Esta ROS não possui capacidade de penetração através da membrana lipídica, agindo somente no compartimento onde é produzida. O ânion superóxido participa da formação do peróxido de hidrogênio através da ação da

enzima superóxido dismutase (Nordberg e Arnér, 2001; Nichi, 2003; Maia e Bicudo, 2009; Andrade et al., 2010).

### **3.4.2 Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

É uma ROS com alto potencial reativo. Não é considerado um radical livre, pois não possui um elétron desemparelhado em sua última camada eletrônica. O peróxido de hidrogênio participa da reação de geração do radical hidroxila e, diferente dos outros radicais livres, possui vida longa e é capaz de atravessar membranas biológicas, sendo altamente tóxico para as células (Nordberg e Arnér, 2001; Nichi, 2003; Maia e Bicudo, 2009; Andrade et al., 2010; Barbosa et al., 2010).

### **3.4.3 Radical hidroxila (OH<sup>·</sup>)**

É um radical livre formado a partir do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela reação de Fenton, catalisada por íons ferro (Fe<sup>++</sup>) ou cobre (Cu<sup>++</sup>). Dentre as ROS, este radical é o mais reativo e nocivo para o sistema biológico, sendo capaz de reagir rapidamente com as biomoléculas, desencadeando a peroxidação dos lipídeos através da retirada de um átomo de hidrogênio dos PUFAs da membrana celular (Nordberg e Arnér, 2001; Nichi, 2003; Maia e Bicudo, 2009; Andrade et al., 2010; Barbosa et al., 2010).

## **3.5 Função Espermática vs Espécies Reativas de Oxigênio**

O metabolismo aeróbico está associado com a geração de moléculas pró-oxidantes, os radicais livres ou ROS. A homeostase intracelular é mantida através de uma complexa interação entre ROS e antioxidantes (Agarwal et al., 2006). Quando os oxidantes sobrecarregam o sistema antioxidante de defesa celular, inicia-se um processo de estresse oxidativo.

Segundo Aitken (1995), a primeira indicação de que o estresse oxidativo pode afetar a viabilidade e a função espermática foi feita por MacLeod em 1943, quando observou que o espermatozoide humano, incubado na presença de elevadas concentrações de oxigênio, perdia rapidamente sua motilidade, e que a adição da catalase, um antioxidante enzimático, sob as mesmas condições,

evitava essa perda. O autor sugeriu, ainda, que o agente causal não seria o  $O_2$  em si e, sim, o  $H_2O_2$ , gerado pela segunda eletro-redução do  $O_2$ , realizada pelos próprios espermatozoides.

Fernández-Santos et al. (2008) induziram o estresse oxidativo no sêmen de touros, através da adição de  $100 \mu M Fe^{++}$  e  $1 mM$  ascorbato. O  $Fe^{++}$  é oxidado a  $Fe^{+++}$  reagindo com o ascorbato, produzindo o radical  $OH^{\cdot}$  altamente reativo. Após seis horas de incubação, observaram redução significativa na motilidade espermática total e um aumento no índice de fragmentação de DNA. Não houve diferença significativa na viabilidade espermática e integridade acrossomal.

O excesso de ROS pode ser responsável por reações específicas e inespecíficas em componentes celulares adjacentes, tais como lipídeos insaturados, proteínas e DNA, prejudicando o funcionamento celular normal (Gharagozloo e Aitken, 2011). A geração de altas concentrações de ROS no sêmen está associada ao declínio da qualidade espermática e fragmentação do DNA em garanhões (Baumber et al., 2003), suínos (Valença e Guerra, 2007), cães (Kawakami et al., 2007; Neagu et al., 2011), homens (Cocuzza et al., 2007), touros (Fernández-Santos et al., 2008), veados (Mata-Campuzano et al., 2012a) e carneiros (Mata-Campuzano et al., 2012b).

Estudos sobre infertilidade humana sugerem um aumento significativo na taxa de ROS no sêmen (Agarwal et al., 2006, 2008). Venkatesh et al. (2009) avaliaram homens indianos portadores de infertilidade de etiologia desconhecida e sugeriram, como uma das possíveis causas, os elevados níveis de ROS. Kothari et al. (2010) relataram que, em humanos, componentes industriais, tabagismo e ingestão de álcool são fontes exógenas produtoras de ROS, além das injúrias na medula espinhal e varicocele.

O espermatozoide é uma célula aeróbia; portanto, o oxigênio é essencial para o seu metabolismo. Sabe-se que, sob condições fisiológicas, as ROS são produzidas em baixos níveis pelo espermatozoide, o que enfatiza sua importância em eventos específicos necessários à fecundação (Lamirande et al., 1997; Burnaugh et al., 2007).

Durante o processo de capacitação ocorre um aumento dos níveis de cálcio intracelular, ROS e da tirosina quinase, levando a uma maior produção de

adenosina monofosfato cíclica (AMPC). Estes eventos induzem o espermatozoide a um estado de hiperativação. Sob estas condições, o espermatozoide passa pelo processo de reação acrossomal fisiológica, adquirindo a habilidade de fecundar (Aitken, 1995; Lamirande et al., 1997; Saalu, 2010).

Burnaugh et al. (2007) incubaram espermatozoide equino com cálcio ionóforo, simulando as condições da capacitação espermática, e observaram um aumento significativo na produção do ânion superóxido quando comparado ao grupo controle, demonstrando a participação das ROS na função do gameta masculino. Porém, elevadas concentrações destes elementos podem ocasionar sérios danos à célula espermática (Valença e Guerra, 2007).

Aitken (1995), comparando o sêmen de homens inférteis e férteis, constatou grande quantidade de ROS naqueles inférteis, atribuindo esse aumento aos espermatozoides defeituosos ou não funcionais. De fato, leucócitos e espermatozoides morfológica e funcionalmente anormais, são os principais produtores endógenos de ROS no ejaculado (Maia e Bicudo, 2009). Em equinos, a produção de ROS é significativamente mais alta na presença de crioinjúrias e de espermatozoides com gota citoplasmática proximal ou anormalidades da peça intermediária (Ball et al., 2001; Ball, 2008).

À incubação de espermatozoides de garanhão na presença e ausência de neutrófilos ativados, Baumber et al. (2002) observaram aumento significativo na geração de  $H_2O_2$  e decréscimo na motilidade espermática total quando na presença de neutrófilos.

### **3.6 Peroxidação Lipídica (LPO)**

A peroxidação lipídica pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação dos radicais livres sobre lipídeos poli-insaturados das membranas celulares. Os PUFAs são excelentes alvos para ataques das ROS por possuírem uma ou mais duplas ligações em sua longa cadeia de carbonos. O processo de LPO é iniciado por reações das ROS com os PUFAs e propagado por radicais peroxila. A LPO resulta na formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos citotóxicos, tais como o malondialdeído (MDA), 4-

hidroxynonenal e isoprostanos (Aitken, 1995; Nordberg e Arnér, 2001; Lima e Abdalla, 2001).

A LPO altera a estrutura e permeabilidade da membrana, assim como sua fluidez, podendo prejudicar sua capacidade de fusão, habilidade importante e necessária durante a reação acrossomal, conseqüentemente influenciando a fertilidade (Ferreira e Matsubara, 1997; Maia e Bicudo, 2009; Ball, 2011).

O excesso de  $Fe^{+++}$  e, conseqüentemente, de  $OH^-$ , estimula a LPO (Ferreira e Matsubara, 1997; Benedet e Shibamoto, 2008). Inagaki et al. (2002) purificaram e quantificaram a lactoferrina, uma proteína ferro ligante, no plasma seminal de garanhões e encontraram uma variação de 42 a 453  $\mu\text{g/mL}$ , com valor médio de  $157 \pm 118 \mu\text{g/mL}$ . Ball (2011) sugere que a presença desta proteína possa ser útil na redução de ferro disponível, ajudando na prevenção da LPO.

O espermatozoide equino demonstra ser, aparentemente, mais resistente à peroxidação da membrana quando comparado ao de outras espécies domésticas (Baumber et al., 2000; Neild et al., 2005; Ball, 2008). No entanto, a refrigeração e a criopreservação aumentam a suscetibilidade do espermatozoide equino à LPO (Aurich, 2005). Os danos causados pela LPO foram bem evidenciados na região da peça intermediária (Neild et al., 2005).

A LPO pode ser avaliada e utilizada como indicador do estresse oxidativo celular. Em sistemas biológicos, a mensuração da LPO é feita através dos produtos gerados durante o processo. O método mais utilizado para sua determinação é pela detecção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), neste caso, o MDA (Lima e Abdalla, 2001; Maia e Bicudo, 2009).

Como alternativa para a avaliação da LPO, algumas sondas fluorescentes lipofílicas vêm sendo utilizadas em espermatozoides de mamíferos. O BODIPY<sup>581/591</sup>C<sub>11</sub> é um análogo de ácidos graxos com propriedade fluorescente nas faixas vermelha e verde do espectro de visibilidade (máximo de emissão a 595 nm). Frente à oxidação induzida por radicais livres, sua fluorescência muda do vermelho para o verde. A avaliação pode ser feita através de microscopia de epifluorescência, microscopia confocal de varredura a laser, fluorimetria e citometria de fluxo (Neild et al., 2005; Domínguez-Rebolledo et al., 2010).

Domínguez-Rebolledo et al. (2010) compararam o método do TBARS e as sondas fluorescentes BODIPY<sup>581/591</sup> C<sub>11</sub> (B581) e BODIPY<sup>665/676</sup> C<sub>11</sub> (B665) para quantificar os danos peroxidativos induzidos no sêmen do epidídimo descongelado de veados ibéricos. As sondas fluorescentes foram avaliadas por fluorimetria e citometria de fluxo. Os níveis de LPO encontrados foram semelhantes entre as sondas nas metodologias adotadas, diferindo do método do TBARS. Os resultados deste experimento demonstraram maior precisão das sondas fluorescentes na mensuração da LPO.

### **3.7 Sistema de Defesa Antioxidante**

Antioxidantes são substâncias ou moléculas enzimáticas e não enzimáticas capazes de prevenir, interceptar ou reparar a ação dos oxidantes, convertendo-os em água, protegendo as células e o organismo dos efeitos nocivos ocasionados pela superprodução de ROS (Sies, 1997; Nordberg e Arnér, 2001; Andrade et al., 2010; Luz et al., 2011).

Quanto ao mecanismo de ação, a prevenção é definida como a primeira linha de defesa, caracterizando-se pela proteção contra a formação das ROS e, conseqüentemente, do início das reações em cadeia. Além disso, inclui-se nesse processo a quelação de metais, tais como os íons ferro e cobre, auxiliados por proteínas ligantes de metais como a ferritina, transferrina e, no caso de equinos, a lactoferrina (Inagaki et al., 2002). A interceptação, também conhecida como fase de desativação, atua na transformação de radicais livres em produtos finais não reativos. Uma vez presentes os efeitos da oxidação celular, os antioxidantes também podem atuar na reparação dos mesmos (Sies, 1997).

Segundo Agarwal et al. (2008), os antioxidantes presentes no plasma seminal, protegem os espermatozoides contra as ROS oriundas de espermatozoides anormais, eliminam ROS formadas por leucócitos, previnem a fragmentação do DNA, reduzem as crioinjúrias e bloqueiam a maturação espermática prematura.

Fazem parte deste sistema os antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Os antioxidantes enzimáticos são também denominados de agentes naturais, sendo o primeiro sistema de defesa a agir no organismo,

neutralizando o excesso de ROS e prevenindo danos à estrutura celular, incluindo a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) (Andrade et al., 2010; Luz et al., 2011).

### **3.7.1 Antioxidantes não enzimáticos**

Conhecidos como compostos de baixo peso molecular, fazem parte deste grupo a vitamina C, vitamina A,  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -TOH), ácido  $\alpha$ -lipoico, ácido úrico, zinco, taurina, hipotaurina e coenzima Q10, sendo encontrados no plasma seminal. Os antioxidantes não enzimáticos de maior relevância na reprodução são a vitamina C, o  $\alpha$ -TOH, a glutathione reduzida e, mais recentemente, a melatonina e a coenzima Q10 (Agarwal et al., 2008; Andrade et al., 2010; Carocho e Ferreira, 2013; Yousefian et al., 2014; Izadpanah et al., 2015; Carneiro et al., 2018; Lançonni et al., 2018).

#### **3.7.1.1 Melatonina**

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina), é uma indolamina produzida a partir do aminoácido triptofano, principalmente na glândula pineal (Hardeland et al., 1993), sendo o principal regulador da função reprodutiva em animais dependentes do fotoperíodo, exercendo efeito inibitório em espécies de dias longos, como hamster e equinos, ou estimulante em espécies de dias curtos, como ovinos, caprinos e veados. Contudo, atualmente, sua função como antioxidante natural, vem ganhando destaque. Assim, esta nova função traz benefícios contra o estresse oxidativo, e tem a mitocôndria como o provável e principal local de sua produção, atuando de forma autócrina ou parácrina (Silva et al., 2011; Tan et al., 2013; Cebrián-Perez et al., 2014).

Diferente de outros antioxidantes que se apresentam como hidro ou lipofílicos, a melatonina é anfifílica; portanto, distribui-se tanto em citosol aquoso, como em membranas ricas em lipídeos, sendo capaz de interagir com uma variedade de ROS, incluindo o  $\text{OH}^\cdot$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^\cdot$  e o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^\cdot$ ). Além disso, evidências indicam que a melatonina possa reciclar diversos antioxidantes oxidados, entre eles as vitaminas C e E, glutathione e NADH (Venegas et al., 2012; Tan et al., 2013).

Nas mitocôndrias, a melatonina desempenha um papel, tanto vital quanto funcional, através da neutralização direta de ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS), estímulo das atividades de enzimas antioxidantes como a SOD, por exemplo (Leon et al., 2004), aumento na eficiência da OXPHOS através da cadeia de transporte de elétrons, limitando o vazamento de elétrons, o que diminui a biodisponibilidade destes elementos químicos e, conseqüentemente, a formação de ROS, além de promover, com maior eficácia, a síntese de ATP (Reiter et al., 2003; Li et al., 2012). É provável que a associação destes fatores, faça da melatonina um antioxidante capaz de ajudar na manutenção da integridade mitocondrial, aumentando, assim, as perspectivas de sobrevivência celular pós-estresse crio-osmótico (Paradies et al., 2017).

Em búfalos, a melatonina na dose de 100  $\mu\text{M}$ , após 72 horas de incubação a 27°C, do sêmen fresco diluído com TALP até uma concentração de  $100 \times 10^6$  spz/mL, acrescido do antioxidante, se mostrou eficaz na preservação mitocondrial, promovendo maior percentual de espermatozoides com alta atividade mitocondrial (Li et al., 2012).

Em equinos, a melatonina na concentração de 1  $\mu\text{M}$ , durante incubação *in vitro* por 3 horas a 37°C, está associada à redução da LPO, diminuição de características relacionadas com apoptose espermática e redução da senescência prematura com preservação da estrutura mitocondrial (Balao da Silva et al., 2011). Já na refrigeração do sêmen equino por 48 horas a 5°C, a dose de 1,5 mM se mostrou eficaz ao proporcionar maiores percentuais de motilidade total e progressiva, de células com membranas íntegras, bem como redução da LPO após o período da refrigeração (Izadpanah et al., 2015).

Avaliando o efeito da adição de duas concentrações de melatonina (1  $\mu\text{M}$  e 2 mM) ao longo do processo de criopreservação do sêmen equino, Lançoni et al. (2018) observaram que a menor concentração deste antioxidante, proporcionou maior percentual de células com membrana plasmática íntegra, integridade acrossomal, bem como maior população espermática exibindo alto potencial de membrana mitocondrial.

### **3.7.1.2 Coenzima Q10**

A CoQ10 é um agente lipossolúvel promotor de energia, cuja principal função é o transporte de elétrons e prótons no processo de produção de energia, levando à síntese de ATP na membrana mitocondrial interna, através da cadeia de transporte de elétrons, sendo encontrada em todas as membranas celulares de mamíferos (Lewin e Lavon, 1997; Patel e Sigman, 2008; Carocho e Ferreira, 2013). A CoQ10 pode ser encontrada em três estados redox: totalmente oxidada (ubiquinona, Q), parcialmente reduzida (semiquinona ou ubisemiquinona, SQ) e totalmente reduzida (ubiquinol, QH<sub>2</sub> ou CoQH<sub>2</sub>) (Genova e Lenaz, 2011).

O ubiquinol atua como um potente antioxidante em diversos sistemas biológicos, tais como lipoproteínas e membranas, protegendo-os contra a oxidação, inibindo a formação de hidroperóxidos e, conseqüentemente, prevenindo a LPO (Alleva et al., 1997; Bentinger et al., 2007; Carocho e Ferreira, 2013). Segundo Turunen et al. (2004), este cofator também pode neutralizar radicais lipídicos após sua formação, portanto, atuando na fase de iniciação e de propagação da LPO. Além disso, outra função importante é a regeneração do  $\alpha$ -tocoferol a partir do radical  $\alpha$ -tocoferoxil (Crane e Navas, 1997).

Na célula espermática, a maior concentração de CoQ10 ocorre nas mitocôndrias presentes na peça intermediária, local de intensa produção de energia. Portanto, todo o processo de síntese de ATP do gameta masculino é dependente da disponibilidade deste cofator, e uma deficiência do mesmo pode resultar em redução da motilidade espermática (Lewin e Lavon, 1997; Datta et al., 2009).

Correlações positivas ( $r=0,62$ ;  $p<0,05$ ) são relatadas entre os níveis de ubiquinol e concentração espermática, além de correlação negativa ( $r=-0,56$ ;  $p=0,01$ ) com os níveis de hidroperóxidos (Alleva et al., 1997).

Para avaliar a preservação *in situ* a  $-10^{\circ}\text{C}$  de espermatozoides da cauda do epidídimo de caprinos ( $n=80$ ), Datta et al. (2009) testaram três diluentes contendo lecitina de soja (SLG), CoQ10 (CoQ10G) e a associação de ambas (SLCoQ10G), preparados em meio livre de eletrólitos e contendo glicerol (G). As análises foram feitas após 7 (M-7) e 21 (M-21) dias de preservação, havendo diferença significativa entre os momentos, para todos os tratamentos. Os meios contendo a CoQ10 apresentaram valores de motilidade progressiva

significativamente maiores no M-7 ( $35,5 \pm 0,93\%$  – SLCoQ10G;  $31,5 \pm 0,84\%$  – CoQ10G;  $29,9 \pm 0,69\%$  - SLG;  $p < 0,001$ ). Já no M-21, a motilidade do grupo SLCoQ10G foi superior aos demais tratamentos ( $30,2 \pm 0,62\%$  - SLCoQ10G;  $25,5 \pm 1,12\%$  – CoQ10G e  $23,5 \pm 0,75\%$  - SLG;  $p < 0,001$ ). A maior preservação da viabilidade espermática, ao teste hiposmótico, foi observada no grupo SLCoQ10G, em ambos os momentos, M-7 ( $45,7 \pm 0,95\%$  vs  $39,2 \pm 0,91\%$  – CoQ10G e  $37,9 \pm 0,56$  – SLG;  $p < 0,001$ ) e M-21 ( $41,6 \pm 0,79\%$  vs  $35,4 \pm 1,03\%$  – CoQ10G e  $33,5 \pm 0,73\%$  – SLG;  $p < 0,001$ ). Os autores concluíram que o grupo SLCoQ10G foi mais eficaz na proteção contra o choque térmico pelo frio, sendo responsável pelo maior percentual de motilidade progressiva e integridade da membrana plasmática, atribuindo tais benefícios, principalmente, à CoQ10.

Safarinejad et al. (2012) avaliaram o efeito do ubiquinol sobre as variáveis seminais de homens inférteis ( $n=228$ ) com oligoastenoteratozoospermia (OAT) idiopática. Foram administrados 200 mg/dia de ubiquinol, por via oral, ao grupo tratamento ( $n=114$ ) e, ao grupo controle ( $n=114$ ), o placebo, durante 26 semanas. Foi observado efeito significativo, respectivamente, sobre a concentração espermática ( $28,7 \pm 4,6 \times 10^6/\text{mL}$  vs  $16,8 \pm 4,4 \times 10^6/\text{mL}$ ;  $p=0,005$ ), motilidade ( $35,8 \pm 2,7\%$  vs  $25,4 \pm 2,1\%$ ;  $p=0,008$ ) e morfologia ( $17,6 \pm 4,4\%$  vs  $14,8 \pm 4,1\%$ ;  $p=0,01$ ). Ao comparar com os estudos anteriores empregando a CoQ10, os autores concluíram que o ubiquinol mostrou-se menos eficaz em aumentar o percentual de gametas com morfologia normal (Safarinejad, 2009; Safarinejad, 2012).

Em experimento realizado por Nadjarzadeh et al. (2012), foi avaliado o efeito da CoQ10 sobre a catalase, SOD e  $F_2$ -isoprostanos no plasma seminal de homens inférteis ( $n=47$ ) portadores de OAT idiopática. Os pacientes receberam 200 mg/dia de CoQ10 ( $n=23$ ) ou placebo ( $n=24$ ), durante três meses. Foi observado um aumento nos níveis de CoQ10 no plasma seminal pós-suplementação ( $44,74 \pm 36,47$  vs  $68,17 \pm 42,41$  ng/mL;  $p < 0,001$ ). Além disso, o grupo que recebeu a CoQ10 teve maior atividade das enzimas catalase e SOD, acompanhado por diminuição do isoprostano ( $p=0,012$ ), um biomarcador para LPO. Houve correlação significativa entre as concentrações de CoQ10 e morfologia espermática normal ( $r=0,44$ ;  $p=0,037$ ), catalase ( $r=0,30$ ;  $p=0,041$ ) e

SOD ( $r=0,60$ ;  $p<0,001$ ). Diante dos resultados, constatou-se que suplementar pacientes portadores de OAT com CoQ10 por três meses pode atenuar o estresse oxidativo no plasma seminal, proporcionando uma melhoria das características seminais e atividade das enzimas antioxidantes.

Em estudo *in vitro* com amostras de sêmen oriundas de homens com astenozoospermia, Lewin e Lavon (1997) observaram aumento da motilidade após incubação com 50  $\mu\text{M}$  de CoQ10 a 37°C por 24 horas, quando comparado ao controle ( $35,7 \pm 19,5\%$  vs  $19,1 \pm 9,3\%$ , respectivamente;  $p<0,05$ ).

Talevi et al. (2013) utilizaram amostras de sêmen de pacientes normo ( $n=24$ ) e oligospérmicos ( $n=20$ ) que possuíam motilidade total e progressiva dentro dos valores normais. Foram preparadas, separadamente, soluções de zinco em etanol (10 mg/mL), d-aspartato em solução tampão (50 mg/mL) e CoQ10 em clorofórmio (50 mg/mL), sendo que cada concentração usada havia sido testada previamente. Das três soluções formou-se um único composto (zinco - 10  $\mu\text{g/mL}$  + d-aspartato - 500  $\mu\text{g/mL}$  + CoQ10 - 40  $\mu\text{g/mL}$ ), o qual foi usado no grupo tratamento. De acordo com os resultados obtidos, após 6 horas de incubação, o composto impediu a queda da motilidade quando comparado à amostra controle, e manteve os parâmetros cinéticos médios iniciais dos espermatozoides em pacientes normo e oligospérmicos, além de prevenir a LPO e impedir a fragmentação do DNA espermático.

O mesmo composto utilizado por Talevi et al. (2013) foi testado por Gualtieri et al. (2014), porém, avaliando a eficácia do mesmo sobre as características espermáticas de touros ( $n=7$ ), através de incubação *in vitro* a 37°C, pós-descongelamento, durante 5 h, com avaliações a intervalos de 1 h (M-0, M-1, M-2, M-3, M-4, M-5). Em relação à motilidade espermática total e progressiva, estas diferiram a partir de duas horas de incubação (M-2, M-3;  $p<0,05$  e M-4, M-5;  $p<0,01$ ). O composto foi eficaz na prevenção da fragmentação do DNA, a qual diferiu a partir do M-3 (M-3;  $p<0,05$  e M-4, M-5;  $p<0,01$ ).

Kia et al. (2017) objetivaram verificar os efeitos da CoQ10 (0,5  $\mu\text{M}$ ) na criopreservação do sêmen de carneiros da raça Ghezel. Os resultados demonstraram uma melhora significativa, pós-descongelamento, em diferentes

características espermáticas, tais como motilidade total, linearidade (LIN), velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL), velocidade média de percurso (VAP), integridade de membrana plasmática (eosina-nigrosina) e redução da população espermática morfológicamente anormal. Tais achados levaram os autores a concluir que a adição de 0,5  $\mu\text{M}$  de CoQ10 ao diluente de congelação, melhorou a qualidade do sêmen de carneiros pós-descongelação.

Na criopreservação do sêmen de galos, a CoQ10, em concentrações de 1 e 2  $\mu\text{M}$ , adicionadas ao diluente de congelação, proporcionou maior percentual de espermatozoides com motilidade total e progressiva, viabilidade (citometria de fluxo) e funcionalidade de membrana (teste hiposmótico), atividade mitocondrial, integridade de acrossoma, bem como maiores taxas de fertilização, além de redução da LPO (Masoudi et al., 2018).

Yousefian et al. (2014) avaliaram a CoQ10 na espécie equina, durante a refrigeração do sêmen a 5°C por 48 horas. Testaram as concentrações de 1 e 2  $\mu\text{M}$ , isoladas e em associação com o  $\alpha$ -tocoferol (5 e 10 mM). A associação da CoQ10 (1  $\mu\text{M}$ ) com o  $\alpha$ -tocoferol (5 mM), foi a mais eficaz em proporcionar maiores percentuais de motilidade progressiva, integridade (através da coloração eosina-nigrosina) e funcionalidade (ao teste hiposmótico) da membrana plasmática, e na redução da LPO.

Ainda na espécie equina, a CoQ10, na concentração de 40  $\mu\text{g/mL}$ , também se mostrou eficaz na refrigeração do sêmen por 72 horas a 5°C, com maior percentual de espermatozoides móveis, bem como na prevenção da LPO (Nogueira et al., 2015).

O único relato encontrado na literatura, com a utilização da CoQ10, na criopreservação do sêmen equino, foi publicado recentemente por Carneiro et al. (2018). Os autores testaram diferentes concentrações deste antioxidante (0, 25, 50, 75 e 100  $\mu\text{mol/L}$ ) adicionando-o, ou ao diluente de centrifugação, ou ao de congelação, em amostra seminal oriunda de garanhões com boa e baixa congelabilidade, avaliando nos momentos pós-descongelação (T0) e após 30 minutos de incubação (T30), as seguintes variáveis: cinética espermática, integridade de MP, percentual de espermatozoides não capacitados, produção

de ROS, atividade mitocondrial e LPO. Não houve efeito da concentração de CoQ10 ou tempo para todos os parâmetros avaliados no grupo de boa congelabilidade quando comparados com o controle ( $p>0,05$ ), exceto a peroxidação lipídica ( $p<0,05$ ). Contudo, ganhões de baixa eficiência na congelação, tiveram melhora significativa das características espermáticas avaliadas, exceto para produção de ROS e atividade mitocondrial no T0. Segundo os autores, a concentração de 75  $\mu\text{mols/L}$ , parece ser a ideal, principalmente, quando adicionada ao diluente de centrifugação.

### **3.8 Oxidantes e Estresse Sub-letal**

Oxidantes ou pró-oxidantes, são definidos como produtos químicos que induzem o estresse oxidativo, geralmente através da formação de espécies reativas de oxigênio ou pela inibição de sistemas antioxidantes (Carocho e Ferreira, 2013). Nos últimos anos, uma nova abordagem vem despertando a atenção da comunidade científica. Diferentes estudos relataram melhorias na resistência de oócitos, embriões e espermatozoides, através do estresse controlado (Pribenszky e Vajta, 2011). A hipótese para essa abordagem é o uso do estresse sub-letal leve, que permitirá às células melhorar a tolerância a um evento estressor futuro, como a criopreservação (Sharafi et al., 2014). A alta pressão hidrostática (HHP), estresse osmótico e o uso de substâncias oxidantes, são os principais estressores que têm sido aplicados para esta finalidade (Pribenszky e Vajta, 2011; Sharafi et al., 2014). Estudos demonstraram que, utilizando o tratamento de HHP aos espermatozoides de suínos antes do armazenamento *in vitro*, criopreservação ou inseminação, a sobrevivência e a fertilidade celular melhoraram (Pribenszky et al., 2011)

Com a utilização de oxidantes, para a mesma finalidade, Sharafi et al. (2014) avaliaram a adição de diferentes concentrações de óxido nítrico (NO), ao diluente de congelação de sêmen bovino, objetivando encontrar a faixa de estresse oxidativo sub-letal, com capacidade de aumentar a resistência de uma amostra espermática ao longo do processo de criopreservação. Os autores concluíram que a indução de estresse oxidativo sub-letal com 1  $\mu\text{M}$  de NO seria benéfico para a criopreservação de sêmen de touros, ao proporcionar maior

percentual de células com motilidade total e progressiva, viáveis, com funcionalidade de MP (teste hiposmótico), e menor percentual de espermatozoides apoptóticos, quando comparado ao grupo controle e demais concentrações testadas.

Ainda neste contexto, uma molécula, em especial, vem despertando a atenção, tanto na medicina humana como na medicina veterinária, o ozônio (O<sub>3</sub>). Esta molécula é naturalmente um gás, instável e com meia vida curta (40 minutos a 20°C), formado por três átomos de oxigênio com estrutura cíclica. Sua utilização para fins terapêuticos se dá por um aparelho denominado gerador de ozônio, no qual o gás é produzido em decorrência da passagem do oxigênio puro em gradiente de alta voltagem (5-13 mV), o que resulta na formação de um gás, composto por 95% de O<sub>2</sub> e 5% O<sub>3</sub> (Bocci, 2006).

Apesar do O<sub>3</sub> não ser considerado um radical livre, ele é classificado como um dos mais potentes agentes oxidantes, perdendo apenas para o flúor e o persulfato, sendo capaz de gerar algumas ROS, comumente produzidas através do oxigênio durante a respiração mitocondrial (Bocci et al., 2009). Em fluidos biológicos, este reage com biomoléculas (Figura 3) e dissocia-se em uma molécula de O<sub>2</sub> e um átomo extremamente reativo, o oxigênio atômico (O<sup>·</sup>). Ressalta-se que, a partir da reação acima mencionada, o O<sub>3</sub> já não existe mais no organismo, e sim, os subprodutos da dissociação. Assim, o O<sub>3</sub> em concentrações adequadas pode desencadear vários mecanismos bioquímicos úteis e reativar o sistema antioxidante de defesa celular (Bocci, 2006, Zanardi et al., 2016).



Figura 3. Reação de dissociação do ozônio em fluidos biológicos. Fonte: Bocci (2006)

### 3.9 Citometria de Fluxo

O citômetro de fluxo (CF) é uma ferramenta poderosa para o setor da andrologia animal, pois permite a avaliação rápida e simultânea de milhares de espermatozoides, avaliando-se diferentes regiões e funções espermáticas, em curto intervalo de tempo (Peña et al., 2017). Segundo pesquisas recentes, o

resultado deste tipo de análise pode ser um grande indicativo de fertilidade a campo, com uso no controle de qualidade dos reprodutores a serem utilizados em programa de estação de monta (Barrier Battut et al., 2017).

Basicamente, existem quatro sistemas principais que compõem um CF: o fluídico, o ótico, o eletrônico e o de computação, que requer o manuseio do *software*. A suspensão celular flui através de um sistema tubular, que é exposto a iluminação a laser em pontos específicos, e as emissões registradas das células como resultado dessa iluminação são digitalizadas e processadas pelo computador para fornecer resultados compreensíveis (Hossain et al., 2011).

Peña et al. (2017) complementam que os espermatozoides, quando passam pela interceptação do laser, dispersam a luz deste raio, e moléculas fluorescentes presentes são excitadas e emitem luz em diferentes comprimentos de onda; e lentes apropriadamente posicionadas coletam a dispersão e a luz fluorescente. Uma combinação de divisores de feixes e filtros direciona a fluorescência para detectores, que produzem sinais eletrônicos proporcionais aos sinais ópticos que os atingem. Os dados são coletados individualmente, em cada espermatozoide, e armazenados no computador; onde são analisados e geram-se informações sobre subpopulações na amostra. Esses resultados são exibidos graficamente, em histogramas ou gráficos de pontos.

Os CFs podem ser classificados como analíticos ou selecionadores. Os CFs analíticos são usados apenas para a análise de células, enquanto os selecionadores têm a característica adicional de poderem, com base nos resultados da análise, isolar fisicamente as células ou partículas de interesse. Os selecionadores podem manter um fluxo contínuo, sendo mais indicados para amostras biológicas de alto risco, ou para dividi-la em gotas após a análise do detector, modelo este, usado na separação de espermatozoides, através do sexo cromossômico (Hossain et al., 2011).

### **3.9.1 Fluorocromos e Citometria de fluxo**

Diversos testes laboratoriais têm sido desenvolvidos com o intuito de obter resultados confiáveis nas avaliações espermáticas, aumentando a qualidade do sêmen utilizado em técnicas de reprodução assistida. Esses testes têm permitido

detectar danos em compartimentos e organelas específicas da célula espermática, que não são detectados nas análises de rotina. Neste contexto, o uso de sondas fluorescentes e sua detecção através da citometria de fluxo, se tornaram ferramentas importantes quando há a necessidade de uma avaliação mais precisa e detalhada (Cunha et al., 2015).

Fluorocromos são moléculas fluorescentes que estão inicialmente em repouso, sendo excitadas por determinada fonte luminosa, que emite uma luz de comprimento de onda (responsável pela cor) característica. Quando utilizados em protocolos citofluorimétricos, ou seja, ligados à célula, esta excitação ocorre no momento em que a mesma é interceptada pela luz do laser do CF (Gillan et al., 2005).

Um composto fluorescente absorve a energia da luz em uma faixa de comprimentos de onda característicos para cada um. Essa absorção de luz faz com que um elétron no composto fluorescente aumente seu nível de energia. O excesso de energia é liberado (emissão), e o elétron retorna rapidamente ao estado de origem. Esta transição da energia é denominada fluorescência. A faixa de comprimentos de onda em que um fluorocromo pode ser excitado é chamada de espectro de absorção, um processo que requer maior gasto energético e, portanto, possui menor comprimento de onda. Já a faixa de comprimentos de onda emitida é chamada de espectro de emissão, com intervalo maior de comprimento (Lichtman e Conchello, 2005).

Este intervalo de comprimentos de onda determina os filtros e os canais de detecção que serão utilizados. A combinação de diferentes fluorocromos com múltiplos comprimentos de onda de excitação e emissão permite medições múltiplas e simultâneas. Quando dois ou mais corantes são usados simultaneamente, existe o risco de que seus perfis de emissão coincidam, dificultando a medição verdadeira da fluorescência de cada um. Este resultado pode ser evitado usando-se corantes com intervalos distantes; no entanto, tal fato, nem sempre é possível, havendo a necessidade da utilização de um processo chamado compensação de fluorescência (Peña et al., 2017).

Os principais fluorocromos utilizados na andrologia animal são: SYBR-14, iodeto de propídeo (PI) e Hoechst 33342 (H33342) para diferenciação de

espermatozoides vivos e mortos; contudo, torna-se necessário que o CF seja equipado com raio violeta ou ultravioleta para utilização do H33342 (Plaza Davila et al., 2015); Merocianina 540 e YoPro-1 avaliando-se a fluidez e permeabilidade da MP, respectivamente (Cunha et al., 2015; Peña et al., 2017); o fluoróforo isotiocinato (FITC), associado à aglutininas, como a *Pisum sativum* (PSA), ou *Arachis hypogea* (PNA), para avaliação acrossomal (Celeghini et al., 2007); brometo de etídio (EB) e laranja de acridina (AO) para fragmentação do DNA (Gillan et al., 2005); o iodeto 5,5', 6,6'-tetracloro 1,1,3,3-tetraetil benzimidazol carbocianina (JC-1), rodamina 123 (R123) e mitotracker para verificação da atividade mitocondrial (Hossain et al., 2011; Cunha et al., 2015) e para avaliação da LPO na MP espermática, o BODIPY 581/591 C11 (Peña et al., 2017).

Desta forma, o delineamento experimental através da citometria de fluxo, implica em seleção cuidadosa, dentre outros, dos seguintes aspectos: sondas adequadas compatíveis com o CF que será utilizado no experimento e identificação do potencial de sobreposição dos espectros entre os fluorocromos.

Diante do exposto, conclui-se que as ROS participam de importantes processos fisiológicos como a capacitação espermática, reação acrossomal e a fusão entre gametas. Os sistemas orgânicos contam com a participação dos antioxidantes para manter o equilíbrio, através da neutralização ou atenuação dos radicais livres. Contudo, quando sua produção é excessiva, há sobrecarga do sistema antioxidante de defesa celular. Com isso, ocorre o estresse oxidativo, que tem como consequência a lipoperoxidação dos PUFAs presentes nas membranas espermáticas, um processo altamente deletério para os espermatozoides. Na atualidade, acredita-se que a principal causa de infertilidade nos machos das diversas espécies de mamíferos, deva-se à produção excessiva de ROS. A manipulação e armazenamento do sêmen aumentam a produção de ROS. Buscando solucionar esse problema, estudos têm avaliado os efeitos da adição de agentes antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos ao meio diluidor do sêmen, tanto à refrigeração quanto na congelação; contudo os resultados ainda são controversos, portanto, necessitando de maiores pesquisas nessa área, considerando-se, sobretudo, a

suscetibilidade individual, a variação entre ejaculados e as diferenças entre espécies.

#### 4 REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R.K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.3, p.28-49, 2005.
- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SIKKA, S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v.18, p.325-332, 2006.
- AGARWAL, A.; MAKKER, K.; SHARMA, R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: An update. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.59, p.2-11, 2008.
- AITKEN, R.Y. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v.7, p.659-668, 1995.
- ALLEVA, R.; SCARARMUCCI, A.; MANTERO, F.; BOMPADRE, S.; LEONI, L.; LITTARRU, G.P. The protective role of ubiquinol-10 against formation of lipid hydroperoxides in human seminal fluid. **Molecular Aspects of Medicine**, v.18 (Supplement), p.s221-s228, 1997.
- ALVARENGA, M.A., PAPA, F.O., NETO, C.R. Advances in stallion semen cryopreservation. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.32, p.521-530, 2016.
- 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.
- ANDRADE, E.R.; MELO-STERZA, F.A.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, p.79-85, 2010.
- AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.65-75, 2005.

- AURICH, C.; SEEBER, P.; MULLER-SCHLOSSER, F. Comparison of different extenders with defined protein composition for storage of stallion spermatozoa at 5°C. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p.445-448, 2007.
- BALAO DA SILVA, C.M.; MACÍAS-GARCÍA, B.; MIRÓ-MORÁN, A.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, L.; MORILLO-RODRIGUEZ, A.; ORTEGA-FERRUSOLA, C.; GALLARDO-BOLAÑOS, J.M.; STILWELL, G.; TAPIA, J.A.; PEÑA, F. J. Melatonin reduces lipid peroxidation and apoptotic-like changes in stallion spermatozoa. **Journal of Pineal Research**, v.51, p.172–179, 2011.
- BALL, B.A. Oxidative stress in sperm. In: McCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**. 2.ed. West Sussex: Wiley-Blackwell, cap.98, v.1. p.991-995, 2011.
- BALL, B.A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impact of sperm function and preservation in the horse. **Animal Reproduction Science**, v.107, p.257-267, 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.
- BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; DE PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v.23, p.629-643, 2010.
- BARRIER BATTUT, I.; KEMPFER, A.; LEMASSON, N.; CHEVRIER, L.; CAMUGLI, S. Prediction of the fertility of stallion frozen-thawed semen using a combination of computer-assisted motility analysis, microscopical observation and flow cytometry. **Theriogenology**, v.97, p. 186-200, 2017.
- 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.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J.; MEYERS, S.A. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.24, p.621-628, 2003.

- BAUMBER, J.; VO, A.; SABEUR, K; BALL, B.A. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.57, p.1025-1033, 2002.
- BENEDET, J.A.; SHIBAMOTO, T. Role of transitions metals, Fe(II), Cr(II), Pb(II) and Cd(II) in lipid peroxidation. **Food Chemistry**, v.107, p.165-168, 2008.
- BENTINGER, M.; BRISMAR, K.; DALLNER, G. The antioxidant role of coenzyme Q. **Mitochondrion**, v.7S, p.S41-S50, 2007.
- BOCCI, V.A. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. **Archives of Medical Research**, v.37, p.425-435, 2006.
- BOCCI, V.; BORRELLI, E.; TRAVAGLI, V.; ZANARDI, I. The ozone paradox: Ozone is a strong oxidant as well as a medical drug. **Medicinal Research Reviews**, v.29, p.646--682, 2009.
- BRINSKO, S.P.; BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; SCHUMACHER J.; LOVE C.C.; HINRICHS K.; HARTMAN, D. **Manual of Equine Reproduction**, 3.ed. MOSBY Elsevier, cap.12, p.160-175, 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.
- BUSTAMANTE FILHO, I.C. Estresse oxidativo na criopreservação do sêmen equino. 2006. 77p. (**Dissertação de Mestrado**). Faculdade de Agronomia. Programa de Pós-graduação em Zootecnia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- BÜYÜKLEBLEBICI, S.; TUNCER, P.B; BUCAK, M.N.; EKEN, A.; SARIÖZKAN, S.; TASDEMİR, U.; ENDIRLIK, B.U. Cryopreservation of bull semen: Effects of extender supplemented with different cryoprotectants and antioxidants on sperm motility, antioxidant capacity and fertility results. **Animal Reproduction Science**, v.150, p.77-83, 2014.
- CARNEIRO, J.A.M.; CANISSO, I.F.; BANDEIRA, R.S.; SCHEEREN, V.F.C.; DELL'AQUA, C.P.F.; ALAVRENHA, M.A.; PAPA, F.O.; DELL'AQUA JR. J.A. Effects of coenzyme Q10 on semen cryopreservation of stallions classified as having good or bad semen freezing ability. **Animal Reproduction Science**, v.192, p.107-118, 2018.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v.51, p.15-25, 2013.

CEBRIÁN-PÉREZ, J.A., CASAO, A., GONZÁLEZ-ARTO, M., HAMILTON, T.R.S., PÉREZ-PÉ, R., MUIÑO-BLANCO, T. Melatonin in sperm biology: breaking paradigms. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, p.11-21, 2014

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes, **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p.479-488, 2007.

CERNY, K.L.; HUGHES, S.; CAMPOS, J.R.; COLEMAN, R.J.; TROEDSSON, M.H.T.; SQUIRES, E.L. Fertility of mares inseminated with frozen-thawed semen processed by single layer centrifugation through a colloid. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.32, p.289-291, 2012.

COCUZZA, M; SIKKA, S.C; ATHAYDE, K.S; ARGAWAL, A. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. **International Brazilian Journal of Urology**, v.33, p.603-621, 2007.

CRANE, F.L.; NAVAS, P. The diversity of coenzyme Q function. **Molecular Aspects of Medicine**, v.18 (Supplement), p.s1-s6, 1997.

CUNHA, A.T.M.; CARVALHO, J.O.; DODE, M.A.N. Techniques for sperm evaluation using fluorescent probes. **Semina: Ciências Agrárias**, v.36, p.4365-4376, 2015.

DATTA, U.; SEKAR, M.C.; HEMBRAM, M.L.; DASGUPTA, R. Developments of a new method to preserve caprine cauda epididymal spermatozoa *in-situ* at – 10°C with electrolyte free medium. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.26, p.467-473, 2009.

DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, A.E.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; OLMO, E.; BISBAL, A.; ROS-SANTAELLA, J.L.; GARDE, J.J. Comparison of the TBARS assay and BODIPY C<sub>11</sub> probes for assessing lipid

peroxidation in red deer spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.360-368, 2010.

FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, A.E.; ESTESO, M.C.; GARDE, J.J.; MARTÍNEZ-PASTOR, F. Catalase supplementation on thawed bull spermatozoa abolishes the detrimental and DNA integrity. **International Journal of Andrology**, v.32, p.353-359, 2008.

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.

FLESH, 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.

GENOVA, M.L.; LENAZ, G. New developments on the functions of coenzyme Q in mitochondria. **BioFactors**, v.37, p.330-354, 2011.

GHARAGOZLOO, P.; AITKEN, R.J. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. **Human Reproduction**, v.26, p.1628-1640, 2011.

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.

GILLAN, L.; MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G. Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. **Reproduction, Fertility and Development**, v.16, p.447-454, 2004.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v.63, p.445-457, 2005.

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

- GUALTIERI, R.; BARBATO, V.; FIORENTINO, I.; BRAUN, S.; RIZOS, D.; LONGOBARDI, S.; TALEVI, R. Treatment with zinc, d-aspartate, and coenzyme Q10 protects bull sperm against damage and improves their ability to support embryo development. **Theriogenology**, v.82, p.592-598, 2014.
- HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3.ed. New York: Oxford University, 1999. 936p.
- HARDELAND, R.; REITER, R. J.; POEGGELER, B.; TAN, D. X. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, p.17, p.347–357, 1993.
- HOSSAIN, M.S.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; NAGY, S.; SIQUEIRA, A.P.; RODRIGUEZ- MARTINEZ, H. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. **Asian Journal of Andrology**, v.13, p.406-419, 2011.
- INAGAKI, M.; KIKUCHI, M.; ORINO, K.; OHNAMI, Y.; WATANABE, K. Purification and quantification of lactoferrin in equine seminal plasma. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v.64, p.75-77, 2002.
- IZADPANAH, G.; ZARE SHAHNEH, A.; ZHANDI, M.; YOUSEFIAN, I.; EMAMVERDI, M. Melatonin has a beneficial effect on stallion sperm quality in cool condition. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.35, p.555-559, 2015.
- KAWAKAMI, E.; TAKEMURA, A.; SAKUMA, M.; TAKANO, M.; HIRANO, T.; HORI, T. Superoxide dismutase and catalase activities in the seminal plasma of normozoospermic and asthenozoospermic Beagles. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v.69, p.133-136, 2007.
- KAYSER, J.P.; AMANN, R.P.; SHIDELER, R.K. Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.38, p.601-614, 1992.
- KIA, H.D.; BLOOKI, H.; DODRAN, H.V.; MAHDIPOUR, M. Effect of adding coenzyme Q10 and ellagic acid during cryopreservation on post-thaw quality of ram semen. **Iranian Journal of Applied Animal Science**, v.7, n.3, p.445-451, 2017.

KOTHARI, S.; THOMPSON, A.; AGARWAL, A.; PLESSES, S.S. Free radicals: Their beneficial and detrimental effects on sperm functions. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.48, p.425-435, 2010.

KOURY, J.C.; DONANGELO, C.M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**, v.16, p.433-441, 2003.

LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v.2, p.48-54, 1997.

LANÇONI, R.; CELEGHINI, E.C.C.; ALVES, M.B.R.; LEMES, K.M.; DIAZA, A.M.G.; OLIVEIRA, L.Z.; ARRUDA, R.P. Melatonin added to cryopreservation extenders improves the mitochondrial membrane potential of postthawed equine sperm. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.69, p.78-83, 2018.

LEON, J.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D.; SAINZA, R.M.; MAYOA, J.C.; DUNXIAN, TAN.; REITER, R.J. Melatonin and mitochondrial function. **Life Sciences**, v.75, p.765-790, 2004.

LEWIN, A.; LAVON, H. The effect of coenzyme Q10 on sperm motility and function. **Molecular Aspects of Medicine**, v.18 (Supplement), p.s213-s219, 1997.

LI, X.X.; YANG, X.G.; LU, Y.Q.; LU, S.S.; ZHANG, M.; YAO, H.L.; MENG, L.J.; LU, K.H. Protective effects of melatonin against oxidative stress in flow cytometry-sorted buffalo sperm, **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.299-307, 2012.

LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciência Farmacêutica**, v.37, p.293-303, 2001.

LICHTMAN, J.W.; CONCHELLO, J.A. Fluorescence microscopy. **Nature Methods**, v.2, p.910-919, 2005.

LUZ, H.K.M.; WANDERLEY, L.S.; FAUSTINO, L.R.; SILVA, C.M.G.; FIGUEREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, p.956-969, 2011.

MAIA, M.S.; BICUDO, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, p.183-193, 2009.

MASOUDI, R.; SHARAFI, M.; SHAHNEHC, A.Z.; KOHRAMC, H.; NEJATI-AMIRIC, E.; KARIMID, H.; KHODAEI-MOTLAGHE, M.; SHAHVERDIF, A. Supplementation of extender with coenzyme Q10 improves the function and fertility potential of rooster spermatozoa after cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v.198, p.193-201, 2018.

MATA-CAMPUZANO, M.; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M.; OLMO, E.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; GARDE, J.J.; MARTÍNEZ-PASTOR, F. Quality, oxidative markers and DNA fragmentation of red deer thawed spermatozoa after incubation at 37 °C in presence of several antioxidants. **Theriogenology**, v.78, p.1005-1019, 2012a.

MATA-CAMPUZANO, M.; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M.; ÁLVAREZ, M.; ANEL, L.; PAZ, P.; GARDE, J.J.; MARTÍNEZ-PASTOR, F. Effect of several antioxidants on thawed ram spermatozoa submitted a 37 °C up to 4 h. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.907-914, 2012b.

NADJARZADEH, A.; SHIDFAR, F.; AMIRJANNATI, N.; VAFA, M.R.; MONTEVALIAN, S.A.; GOHARI, M.R.; NAZERI KAKHKI, S.A.; AKHONDI, M.M.; SADEGHI, M.R. Effect of coenzyme Q10 supplementation on antioxidant enzymes activity and oxidative stress of seminal plasma: a double-blind randomised clinical trial. **Andrologia**, v.46, p.177-183, 2012

NEAGU, V.R.; GARCÍA, B.M.; RODRÍGUEZ, A.M.; FERRUSOLA, C.O.; BOLAÑOS, J.M.G.; FERNÁNDEZ, L.G.; TAPIA, J.A.; PEÑA, F.J. Determination of glutation peroxidase and superoxide dismutase activities in canine seminal plasma and its relation with sperm quality and lipid peroxidation post thaw. **Theriogenology**, v.75, p.10-16, 2011.

NEILD, D.M.; BROUWERS, J.F.H.M.; COLENBRANDER, B.; AGUERO, A.; GADELLA, B.M. Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v.72, p.230-238, 2005.

NEWCOMBE, J.R.; CUERVO-ARANGO, J. The effect of time of insemination with fresh cooled transported semen and natural mating relative to ovulation on pregnancy and embryo loss rates in the mare. **Reproduction in Domestic Animals**, v.46, p.678-681, 2011.

NICHI, M. Sistema de proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídeos seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de Dourados, MS. 2003. 103p. **Dissertação (Mestrado)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária – Universidade de São Paulo, São Paulo.

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.

NOGUEIRA, B.G.; SAMPAIO, B.F.B.; SOUZA, M.I.L.; COSTA E SILVA, E.V.; ZÚCCARI, C.E.S.N. Coenzyme Q10 and  $\alpha$ -Tocopherol prevent the lipid peroxidation of cooled equine semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v.50, p.1003-1010, 2015.

ORTEGA FERRUSOLA, C.; GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, L.; MACÍAS GARCÍA, B.; SALAZAR-SANDOVAL, C.; MORILLO RODRÍGUEZ, A.; RODRÍGUEZ MARTINEZ, H.; TAPIA, J.A.; PEÑA, F.J. Effect of cryopreservation on nitric oxide production by stallion spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.81, p.1106-1111, 2009.

PARADIES, G.; PARADIES, V.; RUGGIEROL, F.M.; PETROSILLO, G. Mitochondrial bioenergetics decay in aging: beneficial effect of melatonina. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.74, p.3897-3911, 2017.

PATEL, S.R.; SIGMAN, M. Antioxidant therapy in male infertility. **Urologic Clinics of North America**, v.35, p.319-330, 2008.

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

PEÑA, F.; PLAZA DAVILA, M.; BALL, B.; SQUIRES, E.; MARTIN MUÑOZ, P.; ORTEGA FERRUSOLA, C.; BALAO DA SILVA, C. The Impact of reproductive

technologies on stallion mitochondrial function. **Reproduction in Domestic Animals**, v.50, p.529–537, 2015.

PEÑA, F.J.; MARTIN-MUÑOZ, P.; ORTEGA-FERRUSOLA, C. Advances in flow cytometry in basic and applied equine andrology. **Animal Reproduction**, v.14, p.136-142, 2017.

PLAZA DAVILA. M.; MARTIN MUÑOZ, P.; TAPIA J.A.; ORTEGA FERRUSOLA, C.; BALAO DA SILVA, C. C.; PEÑA, F.J. Inhibition of mitochondrial complex I leads to decreased motility and membrane integrity related to increased hydrogen peroxide and reduced ATP production, while the Inhibition of glycolysis has less impact on sperm motility. **PLoS ONE**, v.10, p.1-21, 2015.

PRIBENSZKY, C.; VAJTA, G. Cells under pressure: how sublethal hydrostatic pressure stress treatment increases gametes and embryos performance? **Reproduction, Fertility and Development**, v.23, p.48-55, 2011.

PRIBENSZKY, C.; HORVATH, A.; VEGH, L.; HUANG, S. Y.; KUO, Y.H.; SZENCI, O. Stress preconditioning of boar spermatozoa: A new approach to enhance semen quality. **Reproduction in Domestic Animals**. v.46, p.26-30, 2011.

REITER, R.J.; TAN, D.X.; MAYO, J.C.; SAINZ, R.M.; LEON, J.; CZARNOCKI, Z. Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. **Acta Biochimica Polonica**, v.50, p.1129-1146, 2003.

SAALU, L.C. The incriminating role of reactive oxygen species in idiopathic male infertility: An evidence based evaluation. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.13, p.413-422, 2010.

SAFARINEJAD, M.R. Efficacy of coenzyme Q10 on semen parameters, sperm function and reproductive hormones in infertile men. **Journal of Urology**, v.182,.237-248, 2009.

SAFARINEJAD, M.R. The effect of coenzyme Q(10) supplementation on partner pregnancy rate in infertile men with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia: an open-label prospective study. **International Urology and Nephrology**, v.44, p.689-700, 2012.

SAFARINEJAD, M.R.; SAFARINEJAD, S.; SHAFIEI, N.; SAFARINEJAD, S. Effects of the reduced form of coenzyme Q10 (ubiquinol) on semen parameters

in men with idiopathic infertility: a double-blind, placebo controlled, randomized study. **Journal of Urology**, v.188, p.526-531, 2012.

SANOCKA, D.; KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.2, p.12-19, 2004.

SAS. **Statistical Analysis System**. SAS/STAT software, Version 8.02, 2001.

SHARAFI, M.; ZHANDI, M.; SHAHVERDI, A.; SHAKERI, M. Beneficial effects of nitric oxide induced mild oxidative stress on post-thawed bull semen quality. **International Journal of Fertility and Sterility**, v.9, p.230-237, 2015.

SIEME, H.; OLDENHOF, H.; WOLKERS, W.F. Sperm membrane behaviour during cooling and cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v.50, p.20-26, 2015.

SIEME, H.; OLDENHOF, H.; WOLKERS, W.F. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. **Animal Reproduction Science**, v.169, p.2-5, 2016.

SIES, H. Oxidative stress: Oxidant and antioxidant. **Experimental Physiology**, v.82, p.291-295, 1997.

SILVA, C.M.B.; MACÍAS-GARCÍA, B.; MIRÓ-MORÁN, A.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, L.; MORILLO-RODRÍGUEZ, A.; ORTEGA-FERRUSOLA, C.; GALLARDO-BOLAÑOS, J.M.; STILWELL, G.; TAPIA, J.A.; PEÑA, F.J. Melatonin reduces lipid peroxidation and apoptotic-like changes and stallion spermatozoa. **Journal of Pineal Research**, v.51, p.172-179, 2011.

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 No 9, p.01-38, 1999.

TALEVI, R.; BARBATO, V.; FIORENTINO, I.; BRAUN, S.; LONGOBARDI, S.; GUALTIERI, R. Protective effects of in vitro treatment with zinc, d-aspartate and coenzyme Q10 on human sperm motility, lipid peroxidation and DNA fragmentation. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.11, p.1-10, 2013.

TAN, D.X.; MANCHESTER, L.C.; LIU, X.Y.; ROSALES-CORRAL, S.A.; ACUNA-CASTROVIEJO, D.; REITER, R.J. Mitochondria and chloroplasts as the original sites of melatonin synthesis: a hypothesis related to melatonin's primary function and evolution in eukaryotes. **Journal of Pineal Research**, v.54, p.127-138, 2013.

TURUNEN, M.; OLSSON, J.; DALLNER, G. Metabolism and function of coenzyme Q. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1660, p.171-199, 2004.

VALENÇA, R.M.B; GUERRA, M.M.P. Espécies reativas ao oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.47-53, 2007.

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

VENEGAS, C.; GARCÍA, J. A.; ESCAMES, G.; ORTIZ, F.; LÓPEZ, A.; DOERRIER, C.; GARCÍA-CORZO, L.; LÓPEZ, L.C.; REITER, R.J.; ACUÑA-CASTROVIEJO, D. Extrapineal melatonin: Analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. **Journal of Pineal Research**, v. 52, p.217–227, 2012.

VENKATESH, S.; RIYAZ, A.M.; SHAMSI, M.B.; KUMAR, R.; GUPTA, N.P.; MITTAL, S.; MALHOTRA, N.; SHARMA, R.K.; AGARWAL, A.; DADA, R. Clinical significance of reactive oxygen species in semen of infertile indian men. **First International Journal of Andrology**, v.41, p.251-256, 2009.

YOUSEFIAN I.; ZARE-SHAHNEH, A.; MAHDI ZHANDI, M. The effect of Coenzyme Q10 and  $\alpha$ -Tocopherol in skim milk-based extender for preservation of Caspian stallion. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.34, p.949-954, 2014.

ZANARDI, I.; BORRELLI, G.; VALACCHI, G.; TRAVAGLI, V.; BOCCI, V. Ozone: A multifaceted molecule with unexpected therapeutic activity. **Current Medicinal Chemistry**, v.23, p.304-314, 2016.

## CAPÍTULO 2

### ARTIGO 1

#### COENZIMA Q10 E MELATONINA PROTEGEM O ESPERMATOZOIDE EQUINO CRIOPRESERVADO CONTRA A LIPOPEROXIDAÇÃO

BG Nogueira<sup>1</sup>, JL Bitencourt<sup>2</sup>, B Milan<sup>3</sup>, WVA Reis<sup>3</sup>, RR Pereira<sup>3</sup>, MV Junior<sup>3</sup>, BR Acácio<sup>4</sup>, BFB Sampaio<sup>5</sup>, MIL Souza<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – FAMEZ / UFMS

<sup>2</sup>Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – FAMEZ / UFMS

<sup>3</sup>Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – FAMEZ / UFMS

<sup>4</sup>Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS

<sup>5</sup>Professor Doutor da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – FAMEZ / UFMS

E-mail: [maria.souza@ufms.br](mailto:maria.souza@ufms.br)

**RESUMO** - As biotécnicas aplicadas ao sêmen equino promovem um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e redução da defesa antioxidante natural, tanto pela diluição como remoção parcial do plasma seminal. Os objetivos deste trabalho foram avaliar o efeito da adição de Coenzima Q10 (CoQ10) e melatonina (MEL), isoladamente e em associação, sobre as variáveis espermáticas, e a eficácia dos mesmos na prevenção da lipoperoxidação do sêmen equino, ao longo do processo de criopreservação e durante incubação por 60 minutos a 37°C, pós-descongelação. Utilizaram-se cinco garanhões adultos de fertilidade comprovada, obtendo-se quatro ejaculados por reprodutor, submetendo-os aos seguintes tratamentos: Controle (sem adição de

antioxidantes), melatonina 0,75 mM (MEL1), melatonina 1,5 mM (MEL2), CoQ10 40 µg/mL (Q1), CoQ10 200 µg/mL (Q2), e, a associação das menores concentrações de ambas as substâncias, CoQ10 40 µg/mL + melatonina 0,75 mM (Q1 + MEL1). O grupo Q2 preservou o maior percentual de células com motilidade total e progressiva após os 60 minutos de incubação pós-descongelamento, quando comparado ao grupo controle ( $30,2 \pm 2,5\%$  e  $19,4 \pm 2,1\%$  vs  $21,3 \pm 2,2\%$  e  $13,5 \pm 2,1\%$ ;  $p < 0,05$ ). A CoQ10, em ambas as concentrações testadas, resultou em maior percentual de espermatozoides com membrana plasmática íntegra apresentando alto potencial de membrana mitocondrial, após 30 e 60 minutos de incubação, quando comparada ao grupo controle (Q1 -  $64,8 \pm 9,9\%$ , Q2 -  $65,2 \pm 10,5\%$  vs  $55,1 \pm 10,0\%$  - M-30 e Q1 -  $63,3 \pm 10,4\%$ , Q2 -  $64,6 \pm 10,8\%$  vs  $53,1 \pm 10,6\%$  - M-60;  $p < 0,05$ ). A melatonina conferiu maior estabilidade de membrana (não capacitados) em todos os momentos avaliados, comparando-se ao grupo controle (MEL1 -  $42,1 \pm 6,0\%$ , MEL2 -  $44,0 \pm 6,7\%$  vs  $35,9 \pm 5,9\%$  - M-0; MEL1 -  $40,8 \pm 5,6\%$ , MEL2 -  $42,6 \pm 7,2\%$  vs  $33,1 \pm 6,6\%$  - M-30 e MEL1 -  $37,5 \pm 7,4\%$ , MEL2 -  $39,1 \pm 7,2\%$  vs  $31,3 \pm 6,5\%$  - M-60;  $p < 0,05$ ). Os antioxidantes utilizados, isolados, ou em associação, resultaram em menores níveis de lipoperoxidação em todos os momentos avaliados, comparados ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Conclui-se que a CoQ10 e a melatonina são eficazes na criopreservação do sêmen equino, ao promover maior percentual de espermatozoides com motilidade total e progressiva, com alto potencial de membrana mitocondrial e não capacitados ao longo do processo de congelamento/descongelamento, bem como, após 60 minutos de incubação *in vitro* a 37°C.

**Palavras-chave:** antioxidante não enzimático, estresse oxidativo, ganhão, peroxidação lipídica, ROS

**CONTENTS** - Biotechnology applied for equine semen promotes an increasing on reactive oxygen species levels production and reduction of the natural antioxidant defense, by both dilution and removal of seminal plasma. So, the aims of this study were to evaluate the effect of adding Coenzyme Q10 (CoQ10) and

melatonin (MEL), singly and in combination, on sperm parameters, and their effectiveness in preventing lipid peroxidation of equine semen throughout the process of cryopreservation and during incubation for 60 minutes at 37°C, after thawing. Five adult stallions of proven fertility were used, using four ejaculates each, subjecting them to the following treatments: C=control (without addition of antioxidants); melatonin 0,75 mM (MEL1), melatonin 1,5 mM (MEL2), CoQ10 40 µg/mL (Q1), CoQ10 200 µg/mL (Q2), and the association of lower concentrations of both substances, CoQ10 40 µg/mL + 0,75 mM melatonin (Q1 + MEL1). Q2 group preserved the highest percentage of cells with total and progressive motility after 60 minutes of incubation after thawing when compared to the control group ( $30.2 \pm 2.5\%$  and  $19.4 \pm 2.1\%$  vs  $21.3 \pm 2.2\%$  and  $13.5 \pm 2.1\%$ ;  $p < 0.05$ ). CoQ10 at both concentrations tested showed a higher percentage of sperm intact plasmatic membrane with high mitochondrial membrane potential after 30 and 60 minutes of incubation when compared to the control group (Q1 -  $64.8 \pm 9.9\%$ , Q2 -  $65.2 \pm 10.5\%$  vs  $55.1 \pm 10.0\%$  - M-30 and Q1 -  $63.3 \pm 10.4\%$ , Q2 -  $64.6 \pm 10.8\%$  vs  $53.1 \pm 10.6\%$  - M-60;  $p < 0.05$ ). Melatonin conferred greater membrane stability (non-capacitated) at all moments evaluated compared to control group. (MEL1 -  $42.1 \pm 6.0\%$ , MEL2 -  $44.0 \pm 6.7\%$  vs  $35.9 \pm 5.9\%$  - M-0, MEL1 -  $40.8 \pm 5.6\%$ , MEL2 -  $42.6 \pm 7.2\%$  vs  $33.1 \pm 6.6\%$  - M-30 and MEL1 -  $37.5 \pm 7.4\%$ , MEL2 -  $39.1 \pm 7.2\%$  vs  $31.3 \pm 6.5\%$  - M-60;  $p < 0.05$ ). The antioxidants used, alone or in association, resulted in lower lipid peroxidation levels at all moments, compared to control group ( $p < 0.05$ ). It can be concluded that CoQ10 and melatonin are effective in equine semen cryopreservation by promoting higher percentage of total and progressive motility sperm with high mitochondrial membrane potential and greater membrane stability (non-capacitated) throughout the freezing/thawing process, as well as, after 60 minutes of *in vitro* incubation at 37°C.

**Keywords:** lipid peroxidation, oxidative stress, non-enzymatic antioxidant, ROS, stallion

## INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) é amplamente utilizada no sistema de produção animal e oferece inúmeras vantagens sobre a monta natural, tais como melhor aproveitamento de garanhões geneticamente superiores, diminuição dos acidentes durante a cobertura e redução dos riscos de transmissão de doenças venéreas (Newcombe & Cuervo-Arango, 2011). Contudo, o sêmen *in natura* somente se mantém viável por algum tempo após a colheita. Para aumentar sua longevidade, faz-se necessária a implementação de biotecnologias para prolongar a longevidade do sêmen (Sieme et al., 2015).

A criopreservação, dentre inúmeras vantagens, permite a conservação do material genético, por tempo indeterminado, de garanhões altamente valiosos, e facilita comércio internacional do mesmo. Contudo, tal biotecnologia causa a mortalidade de grande percentual das células espermáticas, além de danos subletais à população sobrevivente. Estas características reduzem a longevidade da amostra e comprometem a fertilidade, resultando em aumento do trabalho e dos custos relacionados à inseminação artificial (Peña et al., 2015).

Durante o processo de congelação/descongelação as células espermáticas são expostas à condições extremamente desfavoráveis, afetando muitas características espermáticas, tais como a motilidade, a atividade respiratória, o *status* da membrana celular e a qualidade do DNA, conseqüentemente reduzindo a viabilidade, inibindo o transporte no sistema genital feminino, alterando o momento da fertilização e, finalmente, afetando o desenvolvimento embrionário (Gillan et al., 2005; Castro et al., 2016).

Outro ponto crítico decorrente do processo de criopreservação do sêmen está relacionado ao aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo a mitocôndria a principal fonte geradora destas substâncias, através da cadeia de transporte de elétrons (Peña et al., 2015). O espermatozoide criopreservado apresenta uma senescência prematura, e estudos apontam que as mitocôndrias são extremamente sensíveis ao processo, com seu comprometimento funcional resultante do aumento na geração de ROS (Ortega Ferrusola et al., 2009; Peña et al., 2015). Tal fato seria a principal causa do estresse oxidativo nas membranas espermáticas, associado ao esgotamento

do sistema antioxidante de defesa, pela remoção de grande parte do plasma seminal, o que leva a uma redução na fertilidade (Büyükleblebici et al., 2014).

Para a maximização da performance reprodutiva em ganhos, busca-se, cada vez mais, a melhoria da qualidade dos processos de conservação do material genético. Assim, diversos estudos vêm acrescentando antioxidantes aos meios diluidores na tentativa de neutralizar os efeitos nocivos das ROS (Yousefian et al., 2014; Nogueira et al., 2015; Carneiro et al., 2018), uma vez que a manipulação, o armazenamento, a refrigeração e a congelação do sêmen resultam em aumento dos níveis de ROS (Aurich, 2008).

Neste contexto, a coenzima Q10 (CoQ10), é considerada como o único antioxidante lipossolúvel capaz de ser sintetizado endogenamente (Turunen et al., 2004), além disso, desempenha um papel bioenergético no metabolismo mitocondrial, através da cadeia de transporte de elétrons na membrana mitocondrial interna (Lewin & Lavon, 1997).

Outro antioxidante, a melatonina, se apresenta como uma molécula anfifílica, portanto se distribui tanto em citosol aquoso, como em membranas ricas em lipídeos, sendo capaz de interagir com uma variedade de ROS, incluindo o radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), o ânion superóxido ( $\text{O}_2^\cdot^-$ ) e o peroxinitrito ( $\text{ONOO}^\cdot$ ). Além disso, evidências indicam que a melatonina possa reciclar diversos antioxidantes oxidados, entre eles as vitaminas C e E (Venegas et al., 2012; Tan et al., 2013).

Nas mitocôndrias, a melatonina desempenha papel, tanto vital quanto funcional, através da neutralização direta de ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS), estímulo das atividades de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), por exemplo (Leon et al., 2004), aumento na eficiência da fosforilação oxidativa (OXPHOS) através da cadeia de transporte de elétrons, limitando o vazamento de elétrons, o que diminui a biodisponibilidade destes elementos químicos e, conseqüentemente, a formação de ROS, além de promover, com maior eficácia, a síntese de ATP (Reiter et al., 2003; Li et al., 2012). É provável que a associação destes fatores, faça da melatonina um antioxidante capaz de ajudar na manutenção da integridade

mitocondrial, aumentando, assim, as perspectivas de sobrevivência celular pós-estresse crio-osmótico (Paradies et al., 2017).

A CoQ10 e a melatonina vem sendo objeto de grande interesse nas pesquisas; ambas já demonstraram resultados benéficos, tanto na refrigeração (Yousefian et al., 2014; Izadpanah et al., 2015; Nogueira et al., 2015), quanto na congelação (Carneiro et al., 2018; Lançoni et al., 2018) do sêmen equino. Contudo, até o momento, ainda não foram avaliados os efeitos da associação de ambos os antioxidantes, na criopreservação do sêmen equino, assim como a capacidade dos mesmos em prolongar a longevidade do sêmen pós-descongelação.

Desta forma, os objetivos do presente experimento foram avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de CoQ10 e melatonina, ao diluente de congelação de sêmen equino, isoladamente ou em associação, durante o processo de congelação/descongelação, sobre os parâmetros de cinética espermática, integridade da membrana plasmática e do acrossoma, capacitação espermática, atividade mitocondrial e susceptibilidade à lipoperoxidação, bem como na manutenção das características espermáticas, durante incubação *in vitro* por 60 minutos a 37°C.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS**

O experimento foi realizado no Laboratório Multiusuário de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sendo o projeto de pesquisa autorizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o número 913/2017. Utilizaram-se quatro ejaculados de cinco garanhões adultos (n = 20), com fertilidade comprovada, com idades entre 6 e 17 anos, alojados em propriedades próximas a Campo Grande/MS.

As concentrações de antioxidantes utilizadas neste experimento foram escolhidas, baseadas na literatura (Yousefian et al., 2014; Izadpanah et al., 2015; Nogueira et al., 2015). Ressalta-se que, neste momento, ainda não existiam

relatos com a utilização destas substâncias na criopreservação do sêmen de garanhões, e fez-se um estudo piloto com quatro garanhões e um ejaculado de cada animal. Escolheram-se, para a execução do trabalho, as duas melhores concentrações de cada antioxidante isolado e a melhor associação entre eles.

As substâncias antioxidantes (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) foram diluídas em DMSO até as concentrações de 0,75 mM e 1,5 mM para a melatonina e 40 µg/mL e 200 µg/mL de coenzima Q10, de forma que a concentração final máxima de DMSO fosse de 0,1%, e adicionadas ao diluente de congelação (Botucrio<sup>®</sup>, Botupharma, Botucatu, São Paulo, Brasil), formando os seguintes grupos experimentais: C: Controle; MEL1: 0,75 mM de melatonina; MEL2: 1,5 mM de melatonina; Q1: 40 µg/mL de coenzima Q10; Q2: 200 µg/mL de coenzima Q10 e MEL1 + Q1: 0,75 mM de melatonina + 40 µg/mL de coenzima Q10.

## **COLHEITA E TRANSPORTE DO SÊMEN**

Realizaram-se quatro colheitas de sêmen por garanhão (n=20), utilizando vagina artificial modelo Botucatu (Botupharma, Botucatu, São Paulo, Brasil), mantida a uma temperatura entre 42 e 45°C, com o auxílio de uma fêmea em estro ou manequim, durante os meses de maio a julho de 2018.

O ejaculado foi mantido em banho-maria a 37°C durante as análises da motilidade subjetiva (0-100%) e vigor (escore 0-5). Somente ejaculados com motilidade  $\geq 70\%$  e vigor  $\geq 3$  prosseguiram à congelação. Após a colheita e avaliação seminais, diluiu-se uma alíquota contendo  $1,8 \times 10^9$  espermatozoides em Botusêmen<sup>®</sup> (Botupharma, Botucatu, São Paulo, Brasil), obtendo-se uma concentração de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL. O sêmen foi transportado para o laboratório em contêiner a 15°C (Botu-Flex<sup>®</sup>, Botupharma, Botucatu, São Paulo, Brasil), com uso de apenas um gelo reciclável, em intervalo  $\leq 1$  hora após a colheita.

## **PROCESSAMENTO E CONGELAÇÃO DO SÊMEN**

Na chegada ao laboratório, o sêmen foi centrifugado a 600xg por 10 minutos (Fanem Baby, Guarulhos, São Paulo, Brasil), e o sobrenadante desprezado, sendo os *pellets* ressuspendidos com o diluente de congelação Botucrio<sup>®</sup>

(Botupharma, Botucatu, São Paulo, Brasil), a uma concentração de  $200 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Dividiu-se os  $1,8 \times 10^9$  espermatozoides em seis criotubos, aos quais foram acrescidos os antioxidantes, de acordo com cada grupo experimental.

Envasou-se o sêmen em três palhetas de 0,5 mL, de cada tratamento, em uma concentração de  $100 \times 10^6$  espermatozoides por palheta. Após o envase, as palhetas foram colocadas em bandeja específica para congelação, na qual passaram pelo período de estabilização, a 5°C por 20 minutos, transferindo-as para uma caixa térmica contendo nitrogênio líquido e mantendo-as no vapor de nitrogênio por 20 minutos, a 6 cm acima do nível do nitrogênio líquido, para depois serem imersas no mesmo e, então, armazenadas em raques e estocadas em botijão criogênico a -196°C.

## **ANÁLISE DO SÊMEN**

As avaliações seminais foram realizadas antes da congelação (PRÉ), imediatamente após descongelação a 37°C por 30 segundos (M-0) e nos momentos M-30 = após 30 minutos e M-60 = após 60 minutos de incubação a 37°C. Descongelou-se uma palheta de cada tratamento, submetendo-a às seguintes análises: cinética espermática (Sperm Class Analyzer, SCA<sup>®</sup>, Microptic, Barcelona, Espanha), integridade de membrana plasmática e acrossomal, fluidez de membrana (indicativo de capacitação espermática), atividade mitocondrial e suscetibilidade à lipoperoxidação, por citometria de fluxo (CitoFLEX<sup>®</sup>, Beckman Coulter, Brea, Califórnia, EUA), fazendo-se a contagem de, pelo menos, 10.000 células/amostra. Os gráficos gerados a partir dos resultados da citometria de fluxo, utilizados para todas as análises, foram *dot-plots* bi-exponenciais, corretamente compensados.

## **CINÉTICA ESPERMÁTICA**

A cinética espermática foi avaliada de forma objetiva pelo sistema computadorizado CASA (Sperm Class Analyzer, SCA<sup>®</sup>, Microptic, Barcelona, Espanha). Para a avaliação da mesma, 5,0 µL de sêmen foram colocados na câmara de Makler<sup>®</sup> (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) previamente

aquecida a 37°C e o aparelho calibrado conforme as recomendações do fabricante para análise de sêmen equino. Avaliaram-se, aleatoriamente, no mínimo cinco campos por amostra, quanto aos seguintes parâmetros de cinética espermática: motilidade total (MT, %) e motilidade progressiva (MP, %).

### **MEMBRANA PLASMÁTICA, ACROSSOMAL E POTENCIAL MITOCONDRIAL**

Para a avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal e do potencial de membrana mitocondrial, foi utilizada a associação das sondas fluorescentes, Hoechst 33342 (H342), iodeto de propídio (PI), FITC-PNA (aglutinina de amendoim, conjugada ao isotiocianato de fluoresceína) e MitoStatus Red (MST), conforme protocolo descrito por Freitas-Dell'Aqua et al. (2012) e modificado por Camargo (2017).

Diluiu-se 200 µL de sêmen em TALP-PVA, contendo 7 µM de H342, 1,5 µM de PI, 2 ng de FITC-PNA e 20 nM de MST, na concentração de  $5 \times 10^6$  espermatozoides/mL, e, incubou-se por 20 min a 37°C ao abrigo da luz. Posterior ao período de incubação, a amostra prosseguiu para avaliação em citometria de fluxo.

### **FLUIDEZ DE MEMBRANA (CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA)**

Os estágios iniciais da capacitação espermática podem ser medidos pela sonda Merocianina 540, especialmente quando associados com a sonda YO-PRO e Hoechst 33342. Este corante tem característica hidrofóbica, que pode monitorar o grau de estabilidade da membrana pelo padrão dos fosfolípidos apresentados em sua superfície. No processo de capacitação espermática ocorre a inversão dos folhetos internos e externos da membrana plasmática; desta forma, quanto maior a intensidade da fluorescência, maior o grau de desestabilização da membrana.

As amostras de sêmen foram diluídas em TALP-PVA à concentração de  $5 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Em 200 µL dessa solução acrescentou-se: 7 µM de Hoechst 33342, 7,5 µM de Merocianina (M24571 – Life Technologies) e 25 nM de Yo-Pro (YP, Y3603 – Life Technologies) e incubou-se por 20 minutos a 37°C ao abrigo da luz (Freitas-Dell'Aqua et al., 2012)

## **PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA OU LIPOPEROXIDAÇÃO (LPO)**

Para a avaliação da peroxidação lipídica, utilizou-se protocolo de acordo com Guasti et al. (2012), com o uso da sonda C11-BODYPY (D-3861; Molecular Probes), a qual possui uma alta sensibilidade de fluorescência e é um análogo de ácidos graxos poli-insaturados, que se incorpora na membrana celular. Enquanto este fluorocromo está intacto, é observada uma fluorescência vermelha e, com a sua peroxidação, há uma mudança de fluorescência para verde.

Para realização do protocolo, diluiu-se 500 µL de sêmen em TALP-PVA e adicionou-se 5 µM de C11-BODIPY<sup>581/591</sup>, seguido por incubação durante 30 minutos a 37°C. Após a incubação, foram realizadas duas lavagens consecutivas através de centrifugação a 300xg por 5 minutos, com TALP-PVA, sendo o *pellet* ressuspenso em 500 µL de TALP-PVA.

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

O delineamento experimental foi em parcelas subdivididas, considerando-se a adição de coenzima Q10 (CoQ10) e da melatonina (MEL), isoladas e em associação, como tratamento, e os momentos de avaliação como sub-parcelas. Para comparar as variáveis dependentes (motilidade, integridade da membrana plasmática, acrossomal, capacitação espermática, atividade mitocondrial e lipoperoxidação) utilizou-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. Compararam-se as médias pelo teste de *Duncan*, em nível de 5% de significância. As variáveis expressas em porcentagem foram transformadas em arco seno ( $x/100$ ), de acordo com o sugerido por Sampaio (2007).

## **RESULTADOS**

Os valores médios das variáveis seminais pré-congelação foram: motilidade total -  $82,3 \pm 2,6\%$ ; motilidade progressiva -  $70,8 \pm 2,7\%$ ; membranas plasmática e acrossomal íntegras -  $64,5 \pm 4,0\%$ ; membrana plasmática íntegra com alto

potencial de membrana mitocondrial -  $64,5 \pm 7,5\%$ ; membrana plasmática íntegra e não capacitados -  $57,4 \pm 3,0\%$  e nível de lipoperoxidação de  $7705,3 \pm 520,5$  (intensidade de fluorescência – unidades arbitrárias).

Ao longo do processo de criopreservação, e do tempo de incubação (tabelas 1 para M-0, 2 para M-30 e 3 para M-60), houve queda de todos os valores médios das variáveis espermáticas analisadas, exceto para o grau de peroxidação lipídica, que aumentou.

Na tabela 2 observa-se que o grupo Q2 apresentou maior percentual de células com motilidade progressiva após 30 minutos de incubação, sendo este superior ( $p < 0,05$ ) aos grupos Q1, MEL1 e controle, contudo, sem diferir dos grupos MEL2 e MEL1 + Q1 ( $p > 0,05$ ). Após 60 minutos de incubação (tabela 3), o grupo Q2 foi superior ao controle e MEL1 ( $p < 0,05$ ), tanto para motilidade total, quanto motilidade progressiva, sem diferir dos demais tratamentos ( $p > 0,05$ ).

Os antioxidantes testados, tanto isoladamente como em associação, não proporcionaram diferenças significativas no percentual de espermatozoides com membranas plasmáticas e acrossomal íntegras ( $p > 0,05$ ), ao longo do processo de congelação/descongelação, bem como no decorrer do período de incubação.

A coenzima Q10, em ambas as concentrações testadas, proporcionou valores significativamente superiores ao grupo controle ( $p < 0,05$ ) no percentual de células com membrana plasmática íntegra com alta atividade mitocondrial, após 30 e 60 minutos de incubação a  $37^\circ\text{C}$  (tabelas 2 e 3). Não houve diferença entre os demais tratamentos nos mesmos momentos, assim como entre todos os grupos experimentais, imediatamente pós-descongelação (M-0).

Tabela 1. Valores médios ( $\pm$  erro padrão) das variáveis espermáticas pós-descongelamento do sêmen equino com antioxidantes não enzimáticos isolados ou em associação, Campo Grande, MS.

Variável	Pós-descongelamento (M-0)					
	Controle	MEL1	MEL2	Q1	Q2	MEL1 + Q1
MT (%)	41,3 $\pm$ 3,9	40,1 $\pm$ 3,5	43,0 $\pm$ 3,6	43,1 $\pm$ 3,6	46,4 $\pm$ 4,1	43,2 $\pm$ 2,7
MP (%)	29,7 $\pm$ 2,6	28,0 $\pm$ 2,9	30,5 $\pm$ 2,8	30,3 $\pm$ 2,6	36,5 $\pm$ 2,8	29,4 $\pm$ 2,3
MIAI (%)	36,3 $\pm$ 3,5	32,8 $\pm$ 3,6	33,2 $\pm$ 3,3	38,1 $\pm$ 4,0	39,9 $\pm$ 3,6	38,0 $\pm$ 2,2
MI/Alto PMM (%)	61,3 $\pm$ 10,2	61,0 $\pm$ 10,1	63,5 $\pm$ 9,7	64,9 $\pm$ 10,6	66,3 $\pm$ 10,1	64,8 $\pm$ 9,3
MI/N-CAP (%)	35,9 $\pm$ 5,9 <sup>b</sup>	42,1 $\pm$ 6,0 <sup>a</sup>	44,0 $\pm$ 6,7 <sup>a</sup>	38,3 $\pm$ 6,3 <sup>ab</sup>	39,1 $\pm$ 5,2 <sup>ab</sup>	41,7 $\pm$ 5,8 <sup>ab</sup>
LPO	9858,1 $\pm$ 1066,7 <sup>a</sup>	7493,3 $\pm$ 556,3 <sup>b</sup>	7102,3 $\pm$ 445,9 <sup>b</sup>	7760,1 $\pm$ 551,9 <sup>b</sup>	7222,1 $\pm$ 370,9 <sup>b</sup>	7053,8 $\pm$ 419,1 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Letras diferentes na linha indicam diferença entre médias pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ )

MT – motilidade total; MP – motilidade progressiva; MI – membrana plasmática íntegra; AI – acrossoma íntegro; N-CAP – não capacitado; Alto PMM – alto potencial de membrana mitocondrial; LPO (BODIPY C<sub>11</sub>) – peroxidação lipídica, resultados expressos em intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias); MEL1 = Melatonina 0,75 mM; MEL2 = Melatonina 1,5 mM; Q1 = Coenzima Q10 40  $\mu$ g/mL; Q2 = Coenzima Q10 200  $\mu$ g/mL

Tabela 2. Valores médios ( $\pm$  erro padrão) das variáveis espermáticas pós-incubação por 30 minutos a 37°C do sêmen equino com antioxidantes não enzimáticos isolados ou em associação, Campo Grande, MS

Pós-incubação por 30 minutos (M-30)						
Variável	Controle	MEL1	MEL2	Q1	Q2	MEL1 + Q1
MT (%)	32,2 $\pm$ 2,9	30,6 $\pm$ 2,7	34,3 $\pm$ 2,6	33,7 $\pm$ 2,9	36,8 $\pm$ 2,8	32,2 $\pm$ 2,6
MP (%)	20,5 $\pm$ 2,4 <sup>b</sup>	19,1 $\pm$ 2,1 <sup>b</sup>	24,1 $\pm$ 2,4 <sup>ab</sup>	21,4 $\pm$ 2,4 <sup>b</sup>	27,5 $\pm$ 2,2 <sup>a</sup>	22,4 $\pm$ 2,2 <sup>ab</sup>
MIAI (%)	35,3 $\pm$ 2,9	32,1 $\pm$ 3,2	32,7 $\pm$ 4,5	37,8 $\pm$ 3,7	39,1 $\pm$ 3,9	35,4 $\pm$ 2,8
MI/Alto PMM (%)	55,1 $\pm$ 10,0 <sup>b</sup>	58,9 $\pm$ 10,5 <sup>ab</sup>	59,5 $\pm$ 10,6 <sup>ab</sup>	64,8 $\pm$ 9,9 <sup>a</sup>	65,2 $\pm$ 10,5 <sup>a</sup>	63,8 $\pm$ 10,0 <sup>ab</sup>
MI/N-CAP (%)	33,1 $\pm$ 6,6 <sup>b</sup>	40,8 $\pm$ 5,6 <sup>a</sup>	42,6 $\pm$ 7,2 <sup>a</sup>	35,6 $\pm$ 6,6 <sup>ab</sup>	36,9 $\pm$ 6,0 <sup>ab</sup>	39,9 $\pm$ 5,5 <sup>ab</sup>
LPO	10357,6 $\pm$ 509,9 <sup>a</sup>	8228,8 $\pm$ 501,7 <sup>b</sup>	7466,0 $\pm$ 448,0 <sup>b</sup>	8187,8 $\pm$ 430,8 <sup>b</sup>	7610,2 $\pm$ 343,2 <sup>b</sup>	7054,9 $\pm$ 335,2 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Letras diferentes na linha indicam diferença entre médias pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ )

MT – motilidade total; MP – motilidade progressiva; MI – membrana plasmática íntegra; AI – acrossoma íntegro; N-CAP – não capacitado; Alto PMM – alto potencial de membrana mitocondrial; LPO (BODIPY C<sub>11</sub>) – peroxidação lipídica, resultados expressos em intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias); MEL1 = Melatonina 0,75 mM; MEL2 = Melatonina 1,5 mM; Q1 = Coenzima Q10 40  $\mu$ g/mL; Q2 = Coenzima Q10 200  $\mu$ g/mL

Tabela 3. Valores médios ( $\pm$  erro padrão) das variáveis espermáticas pós-incubação por 60 minutos a 37°C do sêmen equino com antioxidantes não enzimáticos isolados ou em associação, Campo Grande, MS

Pós-incubação por 60 minutos (M-60)						
Variável	Controle	MEL1	MEL2	Q1	Q2	MEL1 + Q1
MT (%)	21,3 $\pm$ 2,2 <sup>b</sup>	20,2 $\pm$ 2,6 <sup>b</sup>	25,3 $\pm$ 2,2 <sup>ab</sup>	24,0 $\pm$ 2,6 <sup>ab</sup>	30,2 $\pm$ 2,5 <sup>a</sup>	22,9 $\pm$ 2,4 <sup>ab</sup>
MP (%)	13,5 $\pm$ 2,1 <sup>b</sup>	13,2 $\pm$ 1,9 <sup>b</sup>	17,6 $\pm$ 1,8 <sup>ab</sup>	15,7 $\pm$ 2,0 <sup>ab</sup>	19,4 $\pm$ 2,1 <sup>a</sup>	16,2 $\pm$ 1,9 <sup>ab</sup>
MIAI (%)	31,4 $\pm$ 5,4	29,4 $\pm$ 4,6	30,1 $\pm$ 5,2	34,1 $\pm$ 5,4	34,9 $\pm$ 4,1	33,2 $\pm$ 5,8
MI/Alto PMM (%)	53,1 $\pm$ 10,6 <sup>b</sup>	57,4 $\pm$ 10,7 <sup>ab</sup>	56,5 $\pm$ 10,6 <sup>ab</sup>	63,3 $\pm$ 10,4 <sup>a</sup>	64,6 $\pm$ 10,8 <sup>a</sup>	60,5 $\pm$ 11,2 <sup>ab</sup>
MI/N-CAP (%)	31,3 $\pm$ 6,5 <sup>b</sup>	37,5 $\pm$ 7,4 <sup>a</sup>	39,1 $\pm$ 7,2 <sup>a</sup>	34,5 $\pm$ 7,5 <sup>ab</sup>	35,2 $\pm$ 6,5 <sup>ab</sup>	38,5 $\pm$ 7,6 <sup>a</sup>
LPO	11209,7 $\pm$ 717,1 <sup>a</sup>	8376,7 $\pm$ 420,8 <sup>b</sup>	7796,1 $\pm$ 413,0 <sup>b</sup>	8766,2 $\pm$ 428,4 <sup>b</sup>	7701,9 $\pm$ 521,3 <sup>b</sup>	7062,7 $\pm$ 468,9 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Letras diferentes na linha indicam diferença entre médias pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ )

MT – motilidade total; MP – motilidade progressiva; MI – membrana plasmática íntegra; AI – acrossoma íntegro; N-CAP – não capacitado; Alto PMM – alto potencial de membrana mitocondrial; LPO (BODIPY C<sub>11</sub>) – peroxidação lipídica, resultados expressos em intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias); MEL1 = Melatonina 0,75 mM; MEL2 = Melatonina 1,5 mM; Q1 = Coenzima Q10 40 µg/mL; Q2 = Coenzima Q10 200 µg/mL

Em relação ao estágio de capacitação espermática, ambos os grupos compostos pela melatonina (MEL1 e MEL2), foram significativamente superiores ao grupo controle ( $p < 0,05$ ), demonstrando maior percentual de espermatozoides com membrana plasmática íntegra e não capacitados, em todos os momentos avaliados, contudo, sem diferir dos demais grupos com antioxidantes. Após 60 minutos de incubação, o grupo MEL1 + Q1 também apresentou resultado superior ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). Contudo, não houve diferença estatística entre os tratamentos com antioxidantes durante todo período de incubação.

As substâncias antioxidantes nas concentrações utilizadas neste experimento se mostraram eficazes na redução da LPO, exibindo valor significativamente menor de intensidade de fluorescência ( $p < 0,05$ ), comparando-se ao grupo controle, em todos os momentos avaliados.

## **DISCUSSÃO**

Histórica e culturalmente, cavalos são selecionados para reprodução com base no *pedigree* e desempenho atlético, e não por características reprodutivas; sendo assim, não são submetidos à seleção para a fertilidade (Gibb & Aitken, 2016), o que pode resultar em animais com baixa qualidade seminal e/ou pouca tolerância na utilização de biotécnicas aplicadas ao sêmen, como a criopreservação.

De fato, a criopreservação do sêmen causa diferentes tipos de danos aos espermatozoides, e são decorrentes do choque térmico ao frio, choque osmótico e estresse oxidativo (Baumber et al., 2003; Burnaugh et al., 2010). Tais lesões resultam em lipoperoxidação, pela produção excessiva de ROS, disfunção mitocondrial, depleção do sistema de reserva intracelular de ATP, lesões irreversíveis nas membranas plasmática e acrossomal e queda acentuada da motilidade espermática (Darr et al., 2016). Segundo Peña et al. (2009), geralmente, existe um decréscimo de 50% da motilidade após um ciclo de congelamento/descongelamento.

A CoQ10 e a melatonina, além de agirem como antioxidantes, apresentam diversas características particulares necessárias ao funcionamento celular normal, como por exemplo, no metabolismo espermático e na preservação

estrutural mitocondrial (Gibb & Aitken, 2016; Lançoni et al., 2018). Desta forma, no presente experimento, as referidas substâncias foram adicionadas ao diluente de congelação visando a minimização dos efeitos nocivos relacionados ao processo de criopreservação.

Os resultados obtidos demonstraram que a CoQ10, na maior concentração testada (200 µg/mL), foi eficaz na preservação da motilidade total e progressiva após 60 minutos de incubação a 37°C, pós-descongelação. Tais resultados são similares aos encontrados na preservação *in situ* a -10°C de espermatozoides da cauda do epidídimo de caprinos (Datta et al., 2009), em humanos portadores de astenozoospermia (Lewin & Lavon, 1997), em homens normospérmicos e oligoespérmicos (Talevi et al., 2013), em touros (Gualtieri et al., 2014) e, mais recentemente, em equinos, no sêmen refrigerado (Nogueira et al., 2015) e criopreservado de garanhões com baixa tolerância à congelação (Carneiro et al., 2018). Tal resultado pode ser explicado pela função bioenergética desempenhada pela CoQ10, a qual se dá através do transporte de prótons e elétrons na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, levando à síntese de ATP (Lewin & Lavon, 1997; Patel & Sigman, 2008; Carocho & Ferreira, 2013); desta forma, o processo de produção de ATP no gameta masculino é dependente da disponibilidade de CoQ10 e a deficiência deste cofator pode resultar em redução da motilidade (Lewin & Lavon 1997).

A composição de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) da membrana espermática e a proporção colesterol:fosfolipídeos estão estreitamente relacionadas à sua fluidez e resistência ao choque térmico pelo frio, respectivamente, e estes fatores explicam e afetam a qualidade seminal em geral (Aurich, 2005; Macías García et al., 2011). No caso do espermatozoide equino, tal proporção é relativamente baixa quando comparada com a de outras espécies (Darin-Bennett & White, 1977). Tal fato, associado à remoção de grande parte do plasma seminal e, portanto, do sistema de defesa antioxidante, para o processo de criopreservação, tornam o espermatozoide equino, extremamente sensível à congelação e aos efeitos nocivos da LPO decorrente do estresse oxidativo (Gibb & Aitken, 2016).

A CoQ10 é lipossolúvel (Littarru & Tiano, 2007), e a melatonina anfifílica; portanto, ambas as substâncias têm a capacidade de distribuir-se em membranas ricas em lipídeos (Turunen et al., 2004; Venegas et al., 2012). Além disso, são responsáveis pela reciclagem de diversos antioxidantes, exercem papel vital para o metabolismo mitocondrial e, conseqüentemente, aumentando a eficiência da OXPHOS, levando à diminuição na produção de ROS (Crane & Navas, 1997; Leon et al., 2004).

Até o momento, este é o primeiro experimento a testar a associação da CoQ10 e MEL, assim, acreditava-se que tais antioxidantes e, principalmente, a sua associação, seriam eficazes na manutenção da integridade da MP ao longo do processo de congelação/descongelação, através da redução da LPO. Contudo, não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos e momentos avaliados para o percentual de células com membranas plasmática e acrossomal íntegras.

A gema de ovo, presente no diluente de congelação utilizado neste experimento, é rica em fosfolipídios e lipoproteínas de baixa densidade. Tal fato, ajuda na manutenção da integridade da MP ao longo do processo de congelação/descongelação do espermatozoide (Gibb & Aitken, 2016; Watson, 1976) e pode competir com antioxidantes lipofílicos na sua incorporação à MP (Carneiro et al., 2018); assim, provavelmente, deva-se usar uma maior concentração de antioxidante quando na presença da gema de ovo (Khalifa et al., 2008). Contudo, ao aumentar a concentração de um antioxidante ao meio diluente, corre-se o risco de alterar sua densidade e, com isso, afetar outros parâmetros espermáticos, bem como o risco do mesmo, em excesso, exercer função pró-oxidante e não antioxidante (Kocyigit & Selek, 2016; Lançoni et al., 2018).

Os resultados deste experimento, avaliando-se o efeito da CoQ10 e MEL sobre a integridade de membranas divergem dos únicos relatos existentes na literatura com a utilização de tais substâncias na criopreservação do sêmen equino (Carneiro et al., 2018; Lançoni et al., 2018; respectivamente). Em relação a CoQ10, a mesma só foi eficaz na preservação da MP, quando utilizada no sêmen de garanhões com baixa tolerância a congelação e em concentração

diferente (75  $\mu\text{mols/L}$  vs 40 e 200  $\mu\text{g/mL}$ ); ainda assim, o melhor aproveitamento foi obtido quando a CoQ10 foi adicionada ao diluente de centrifugação, e não ao de congelação (Carneiro et al., 2018).

A MEL, na concentração de 1,5 mM, também utilizada neste experimento, foi eficaz na preservação da integridade da MP, durante a refrigeração do sêmen equino por 48 horas a 5°C (Izadpanah et al., 2015). Na criopreservação do sêmen equino, Lançoni et al. (2018), testaram a MEL nas concentrações de 1  $\mu\text{M}$  e 2 mM, e observaram que a menor concentração deste antioxidante proporcionou maior percentual de células com membranas plasmática e acrossomal íntegras. Ainda no mesmo experimento, a MEL, na concentração de 2 mM, resultou no menor percentual de células com integridade de MP, sendo significativamente menor do que o grupo controle e demais tratamentos. Tal fato enfatiza as precauções que devem ser tomadas a respeito da utilização de antioxidantes em excesso.

A atividade mitocondrial indica a capacidade do espermatozoide em produzir ATP, sendo o consumo de oxigênio pela mesma, um indicador positivo da função espermática associada à criopreservação. Este parâmetro correlaciona-se positivamente com a motilidade e concentrações de ATP; assim, esta organela vem sendo considerada um biomarcador de fertilidade espermática (Darr et al., 2016)

A criopreservação causa danos à morfologia espermática, em especial, acentuada dilatação da peça intermediária, rica em mitocôndrias, decorrente, principalmente, do choque osmótico, e compromete a funcionalidade e viabilidade do metabolismo oxidativo mitocondrial, resultando em aumento na produção de ROS e de espermatozoides em estado de apoptose (Ball, 2008). A função oxidativa mitocondrial é essencial para a motilidade espermática (Gibb et al., 2014) e pode ser considerada um fator determinante, tanto para avaliação funcional espermática, como para o sucesso da técnica de criopreservação realizada (Varner et al., 2014; Darr et al., 2016; Gibb & Aitken, 2016).

No presente experimento, ambas as concentrações testadas de CoQ10 foram eficazes na preservação funcional mitocondrial, provendo o maior percentual de espermatozoides com MP íntegra e com alto potencial de membrana

mitocondrial, após 30 e 60 minutos de incubação a 37°C, pós-descongelção, sendo superior ao grupo controle ( $p < 0,05$ ), mas sem diferir dos demais grupos de antioxidantes.

Tais resultados podem ser explicados pelo fato da motilidade do espermatozoide equino ser dependente do perfeito funcionamento do metabolismo mitocondrial, mais especificamente da OXPHOS, através da cadeia de transporte de elétrons na membrana mitocondrial interna. Desta forma, os danos mitocondriais durante a criopreservação, podem ser uma das principais causas de diminuição da motilidade e da função espermática pós-descongelção (Gibb et al., 2014; Varner et al., 2014). Portanto, uma maior eficácia da OXPHOS mitocondrial pode trazer benefícios para a motilidade espermática (Yousefian et al., 2014). Além disso, na célula espermática, a maior concentração de CoQ10 ocorre nas mitocôndrias, presentes na peça intermediária, local de intensa produção de energia (Littarru & Tiano, 2007). Este experimento mostrou de forma clara, o poder bioenergético mitocondrial da CoQ10, preservando tanto a motilidade como a função mitocondrial. Este é o primeiro relato na literatura, que demonstra tal sinergia de efeitos da CoQ10 no espermatozoide equino, sendo, portanto, divergente dos demais existentes (Yousefian et al., 2014; Nogueira et al., 2015; Carneiro et al., 2018).

Além disso, a CoQ10 vem sendo descrita como um fator de sobrevivência durante o armazenamento *in vitro* em temperatura ambiente do espermatozoide equino, e em concentrações bem superiores às utilizadas por Nogueira et al. (2015) e Yousefian et al. (2014), contudo não citada pelos autores, vem demonstrando grande potencial como fator de sobrevivência durante o armazenamento de espermatozoides de garanhão em temperatura ambiente (Gibb & Aitken, 2016). De fato, a CoQ10 preservou o maior percentual de células com motilidade total, progressiva e MP íntegra com alto potencial de membrana mitocondrial, após 60 minutos de incubação.

Para a sustentação da produção de ATP, é essencial fornecer à célula espermática, substratos para a OXPHOS, assim como um veículo para o transporte deste substrato para dentro da mitocôndria, como por exemplo o piruvato e a L-carnitina, respectivamente (Gibb & Aitken, 2016). Neste

experimento, acreditava-se que a associação da CoQ10 com a MEL, poderia suprir as funções de substrato e veículo, respectivamente. Contudo, tal efeito não foi evidenciado. É provável que, ambos os antioxidantes citados, atuem como substratos energéticos. Neste contexto, apresenta-se de forma interessante, em investigações futuras, a associação da CoQ10 e MEL com veículos de transporte mitocondrial, como a L-carnitina, por exemplo.

A MEL tem a mitocôndria como o provável e principal local de sua produção, atuando de forma autócrina ou parácrina (Tan et al., 2013; Cebrián-Pérez et al., 2014). Nesta organela, desempenha um papel, tanto vital quanto funcional, através da neutralização direta de ROS e RNS, estímulo das atividades de enzimas antioxidantes como a SOD, por exemplo (Leon et al., 2004), e aumento na eficiência da OXPHOS através da cadeia de transporte de elétrons, promovendo, com maior eficácia, a síntese de ATP (Li et al., 2012; Acuña-Castroviejo et al., 2014). É provável que a associação destes fatores, faça da melatonina um antioxidante capaz de ajudar na manutenção da integridade mitocondrial, aumentando assim, as perspectivas de sobrevivência celular pós-estresse crio-osmótico (Paradies et al., 2017). De fato, a MEL foi eficaz em preservar o maior percentual de células com membranas plasmática e acrossomal íntegras e com alto potencial de membrana mitocondrial, na criopreservação do sêmen equino (Lançoni et al., 2018), ainda que em concentrações bem inferiores das utilizadas neste experimento (1  $\mu$ M). Talvez por estas diferenças nas concentrações, a manutenção da atividade mitocondrial, não foi observada neste experimento.

O estresse osmótico afeta negativamente diferentes características do espermatozoide equino, tais como motilidade, integridade de MP e potencial de membrana mitocondrial (Baumber et al., 2000). A congelação/descongelação do sêmen traz desafios osmóticos à célula e resulta em aumento na produção de ROS, com conseqüente capacitação prematura dos espermatozoides, conhecida como crio-capacitação (Burnaugh et al., 2010).

Durante a capacitação espermática há uma sucessão de eventos fisiológicos, dentre eles ativação dos canais de cálcio, aumento do pH e níveis de cálcio intracelular, ativação da adenil ciclase com aumento da produção de AMP cíclico,

efluxo do colesterol da MP, aumento da fluidez da MP, produção de níveis baixos e controlados de ROS, dentre outros (Benjamin et al., 2012; O'Flaherty, 2015). Sabe-se que a presença moderada de ROS é essencial para a desestabilização da MP espermática, nos estágios pré-capacitação; contudo, em excesso, pode resultar em diferentes níveis de comprometimento do espermatozoide (Valença & Guerra, 2007; Casao et al., 2010;).

O presente estudo demonstrou que a MEL, em ambas as concentrações testadas, e em todos os momentos avaliados, proporcionou maior estabilização de MP às células espermáticas, quando comparado ao grupo controle, e sem diferir dos demais grupos, demonstrando o efeito protetor deste antioxidante contra a crio-capacitação. Similarmente, 1  $\mu$ M de MEL preveniu a capacitação do sêmen de carneiros após 3 horas de incubação *in vitro* a 37°C, enquanto a menor concentração testada (1 pM), ativou a capacitação espermática sob as mesmas condições e resultou em maior percentual de fertilização de oócitos e taxa de clivagem pós-fertilização *in vitro*. Tais resultados evidenciam um efeito direto da MEL na modulação da capacitação espermática (Casao et al., 2010).

Curiosamente, a MEL está presente no fluido folicular e evidências apontam que esta substância possa regular os eventos de capacitação e hiperativação que, normalmente, ocorrem no trato reprodutivo feminino (Brzezinski et al., 1987; Casao et al., 2010; Reiter et al., 2014). Este resultado pode ser explicado pela própria atividade antioxidante da MEL e seu efeito no controle das ROS, em que concentrações muito baixas de antioxidante podem, apenas, reduzir os níveis de ROS ao ponto de não inibir a capacitação, uma vez que baixos níveis destas espécies reativas são necessárias para o controle de tal evento fisiológico (De Lamirande & Cagnon, 1993; O'Flaherty, 2015). Outra hipótese estaria relacionada à capacidade da MEL se ligar à calmodulina (Zhang & Zhang, 2014), e seu envolvimento no controle da capacitação espermática (Si & Olds-Clarke, 2000; Cebrián-Pérez et al., 2014;).

O estresse oxidativo é considerado a principal causa de infertilidade masculina, uma vez que as reações oxidativas em cadeia podem levar à peroxidação dos PUFAs da MP do espermatozoide, degradação de proteínas, danos ao DNA, capacitação espermática prematura, alterações nas vias de

sinalização intracelular e, até mesmo, a apoptose da célula (Agarwal & Majzoub, 2017). Sabe-se que as biotécnicas aplicadas ao sêmen aumentam a produção de ROS, através da manipulação, exposição à luz, choque térmico ao frio e choque osmótico, por exemplo (Aurich, 2008; Sampaio et al., 2018). Todas as etapas citadas foram realizadas neste experimento, o que, provavelmente, contribuiu para o aumento da LPO pós-criopreservação e incubação *in vitro* por 60 minutos a 37°C, principalmente observada no grupo controle.

A forma reduzida da CoQ10, o ubiquinol, atua como um potente antioxidante em diversos sistemas biológicos, como lipoproteínas e membranas, protegendo-os contra a oxidação, inibindo a formação de hidroperóxidos e, conseqüentemente, prevenindo a LPO (Alleva et al., 1997; Bentinger et al., 2007). Adicionalmente, este cofator também pode neutralizar radicais lipídicos após sua formação, agindo na fase de iniciação e de propagação da LPO (Turunen et al., 2004), e realizar a reciclagem de outros antioxidantes (Crane & Navas, 1997).

A melatonina, além de interagir diretamente com uma variedade de ROS, também atua estimulando a atividade de enzimas antioxidantes como a SOD, GPX e CAT, fato que potencializa sua função antioxidante, aumentando a proteção do espermatozoide contra o estresse oxidativo (Venegas et al., 2012; Tan et al., 2013). Além disso, a mesma é mais eficaz que a glutathiona na neutralização de radicais hidroxila e do que a vitamina E no combate ao radical peroxil (Reiter et al., 1997).

No presente trabalho constatou-se que a adição de antioxidantes não enzimáticos, associados ou não, foi efetiva em reduzir o nível de lipoperoxidação do sêmen equino criopreservado, ao longo de 60 minutos de incubação a 37°C, pós-descongelação. Tais resultados corroboram os encontrados na literatura, para a CoQ10 (Talevi et al., 2013; Gualtieri et al., 2014; Yousefian et al., 2014; Nogueira et al., 2015; Carneiro et al., 2018; Masoudi et al., 2018) e para a MEL (Casao et al., 2010; Balao Da Silva et al., 2011; Ashrafi et al., 2013; Izadpanah et al., 2015; Lançonni et al., 2018), resultando em redução dos níveis de LPO.

As substâncias utilizadas neste experimento mostraram resultados promissores. Contudo, ainda há uma grande variabilidade na literatura em

relação às concentrações de antioxidante utilizadas, principalmente no caso da melatonina. A CoQ10 demonstrou ser um potente fator para aumentar a longevidade da célula espermática pós-descongelamento. Tal fato é de suma importância e impactaria positivamente a indústria equina, podendo trazer maior flexibilidade para a inseminação artificial com sêmen congelado, o que, hoje, requer uma grande demanda de tempo no controle da ovulação da égua para posterior inseminação, e que leva ao aumento expressivo dos custos de tal procedimento.

Para direcionamento futuro de pesquisas, acredita-se que a associação da CoQ10 e da melatonina com veículos de transporte mitocondrial, como a L-carnitina, possa trazer ainda mais benefícios ao espermatozoide e à técnica de criopreservação. Diante das recentes evidências sobre a adição de antioxidantes ao diluente de centrifugação ter trazido melhores resultados em comparação ao diluente de congelamento, fazem-se necessárias maiores investigações neste quesito, bem como a avaliação da fertilidade do sêmen equino criopreservado com tais substâncias antioxidantes.

Diante do exposto, conclui-se que a CoQ10 e a melatonina são eficazes na criopreservação do sêmen equino, ao promover maior percentual de espermatozoides com motilidade total e progressiva, com alto potencial de membrana mitocondrial e não capacitados ao longo do processo de congelamento/descongelamento, bem como, durante a incubação *in vitro* a 37°C por 60 minutos.

## **AGRADECIMENTOS**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001  
À Botupharma pela doação dos diluentes de congelamento utilizados neste experimento.

## **REFERÊNCIAS**

Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., Venegas, C., Díaz-Casado, M. E., Lima-

- Cabello, E., López, L. C., ... Reiter, R. J. (2014). Extrapineal melatonin: Sources, regulation, and potential functions. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(16), 2997–3025. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1579-2>
- Agarwal, A., & Majzoub, A. (2017). Antioxidant therapy in idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. *Indian Journal of Urology*, 33(3), 207–214. <https://doi.org/10.4103/iju.IJU>
- Alleva, R., Scaramucci, A., Mantero, F., Bompadre, S., Leoni, L., & Littarru, G. P. (1997). The protective role of ubiquinol-10 against formation of lipid hydroperoxides in human seminal fluid. *Molecular Aspects of Medicine*, 18(SUPPL.). [https://doi.org/10.1016/S0098-2997\(97\)00040-X](https://doi.org/10.1016/S0098-2997(97)00040-X)
- Ashrafi, I., Kohram, H., & Ardabili, F. F. (2013). Antioxidative effects of melatonin on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved bull spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 139(1–4), 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.03.016>
- Aurich, C. (2005). Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, 89(1-4 SPEC. ISS.), 65–75. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.06.025>
- Aurich, C. (2008). Recent advances in cooled-semen technology. *Animal Reproduction Science*, 107(3–4), 268–275. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.04.015>
- Balao Da Silva, C. M., Macías-García, B., Miró-Morán, A., González-Fernández, L., Morillo-Rodríguez, A., Ortega-Ferrusola, C., ... Peña, F. J. (2011). Melatonin reduces lipid peroxidation and apoptotic-like changes in stallion spermatozoa. *Journal of Pineal Research*, 51(2), 172–179. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00873.x>
- Ball, B. (2008). Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science*, 107(3–4), 257–267. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.04.014>
- Baumber, J., Ball, B., Gravance, C. G., Medina, V., & Davies-Morel, M. C. (2000). The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *Journal of Andrology*, 21(6), 895–902. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03420.x>
- Baumber, J., Ball, B., Linfor, J. J., & Meyers, S. (2003). Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *Journal of Andrology*, 24(4), 621–628.
- Benjamin, D., Sharma, R. K., Moazzam, A., & Agarwal, A. (2012). *Studies on Men's Health and Fertility*. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-776-7>
- Bentinger, M., Brismar, K., & Dallner, G. (2007). The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion*, 7(SUPPL.). <https://doi.org/10.1016/j.mito.2007.02.006>
- Brzezinski, A., Seibel, M. M., Lynch, H. J., Deng, M. H., & Wurtman, R. J. (1987). Melatonin in human preovulatory follicular fluid. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 64(4), 865–867. <https://doi.org/10.1210/jcem-64-4-865>

- Burnaugh, L., Ball, B. A., Sabeur, K., Thomas, A. D., & Meyers, S. A. (2010). Osmotic stress stimulates generation of superoxide anion by spermatozoa in horses. *Animal Reproduction Science*, 117(3–4), 249–260. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.05.014>
- Büyükblebici, S., Tuncer, P. B., Bucak, M. N., Eken, A., Sariözkan, S., Taşdemir, U., & Endirlik, B. Ü. (2014). Cryopreservation of bull sperm: Effects of extender supplemented with different cryoprotectants and antioxidants on sperm motility, antioxidant capacity and fertility results. *Animal Reproduction Science*, 150(3–4), 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.09.006>
- Carneiro, J. A. M., Canisso, I. F., Bandeira, R. S., Scheeren, V. F. C., Freitas-Dell'Aqua, C. P., Alvarenga, M. A., ... Dell'Aqua, J. A. (2018). Effects of coenzyme Q10 on semen cryopreservation of stallions classified as having good or bad semen freezing ability. *Animal Reproduction Science*, 192, 107–118. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.02.020>
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. F. R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51(1), 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>
- Casao, A., Mendoza, N., Pérez-Pé, R., Grasa, P., Abecia, J. A., Forcada, F., ... Muino-Blanco, T. (2010). Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility rate. *Journal of Pineal Research*, 48(1), 39–46. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2009.00722.x>
- Castro, L. S., De Assis, P. M., Siqueira, A. F. P., Hamilton, T. R. S., Mendes, C. M., Losano, J. D. A., ... Assumpção, M. E. O. A. (2016). Sperm oxidative stress is detrimental to embryo development: A dose-dependent study model and a new and more sensitive oxidative status evaluation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/8213071>
- Cebrián-Pérez, J., Casao, a, González-Arto, M., dos Santos Hamilton, T., Pérez-Pé, R., & Muño-Blanco, T. (2014). Melatonin in Sperm Biology: Breaking Paradigms. *Reproduction in Domestic Animals*, 49, 11–21. <https://doi.org/10.1111/rda.12378>
- Crane, F. L., Navas, P. (1997). The Diversity of Coenzyme Coenzyme Q in Mitochondria Coenzyme Q in the Plasma Membrane. *Science*, 18(97).
- Darin-Bennett, A., & White, I. G. (1977). Influence of the cholesterol content of mammalian spermatozoa on susceptibility to cold-shock. *Cryobiology*, 14(4), 466–470. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(77\)90008-6](https://doi.org/10.1016/0011-2240(77)90008-6)
- Darr, C. R., Cortopassi, G. A., Datta, S., Varner, D. D., & Meyers, S. A. (2016). Mitochondrial oxygen consumption is a unique indicator of stallion spermatozoal health and varies with cryopreservation media. *Theriogenology*, 86(5), 1382–1392. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.082>
- De Lamirande, E., & Cagnon, C. (1993). Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free Radical Biology and*

- Medicine*, 14(2), 157–166. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(93\)90006-G](https://doi.org/10.1016/0891-5849(93)90006-G)
- Gibb, Z., & Aitken, R. J. (2016). Recent Developments in Stallion Semen Preservation. *Journal of Equine Veterinary Science*, 43(June), S29–S36. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.06.006>
- Gibb, Z., Lambourne, S. R., & Aitken, R. J. (2014). The Paradoxical Relationship Between Stallion Fertility and Oxidative Stress. *Biology of Reproduction*. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.118539>
- Gillan, L., Evans, G., & Maxwell, W. M. C. (2005). Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, 63(2 SPEC. ISS.), 445–457. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.024>
- Gualtieri, R., Barbato, V., Fiorentino, I., Braun, S., Rizos, D., Longobardi, S., & Talevi, R. (2014). Treatment with zinc, d-aspartate, and coenzyme Q10 protects bull sperm against damage and improves their ability to support embryo development. *Theriogenology*, 82(4), 592–598. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.05.028>
- Izadpanah, G., Zare-Shahneh, A., Zhandi, M., Yousefian, I., & Emamverdi, M. (2015). Melatonin Has a Beneficial Effect on Stallion Sperm Quality in Cool Condition. *Journal of Equine Veterinary Science*, 35(7), 555–559. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2015.02.007>
- Izadpanah, G., Zare Shahneh, A., Zhandi, M., Yousefian, I., & Emamverdi, M. (2015). Melatonin has a beneficial effect on stallion sperm quality in cool condition. *Journal of Equine Veterinary Science*. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2015.02.007>
- Khalifa, T. A. A., Lymberopoulos, A. G., & El-Saidy, B. E. (2008). Testing usability of butylated hydroxytoluene in conservation of goat semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(5), 525–530. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00947.x>
- KOCYIGIT, A., & SELEK, S. (2016). Exogenous Antioxidants are Double-edged Swords. *Bezmialem Science*, 4(2), 70–75. <https://doi.org/10.14235/bs.2016.704>
- Lançon, R., Celeghini, E. C. C., Alves, M. B. R., Lemes, K. M., Gonella-Díaz, A. M., Oliveira, L. Z., & Arruda, R. P. de. (2018). Melatonin Added to Cryopreservation Extenders Improves the Mitochondrial Membrane Potential of Postthawed Equine Sperm. *Journal of Equine Veterinary Science*, 69(June), 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.06.006>
- Lavon, H. (1997). PII: The Effect of Coenzyme C1<sub>2</sub> on Sperm Motility and Function. *Science*, 18, 213–219.
- Leon, J., Acuña-Castroviejo, D., Sainz, R. M., Mayo, J. C., Tan, D.-X., & Reiter, R. J. (2004). Melatonin and mitochondrial function. *Life Sciences*, 75(7), 765–790. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.03.003>
- Li, X. X., Yang, X. G., Lu, Y. Q., Lu, S. S., Zhang, M., Yao, H. L., ... Lu, K. H. (2012). Protective Effects of Melatonin against Oxidative Stress in Flow Cytometry-sorted Buffalo Sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, 47(2), 299–307. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01858.x>

- Littarru, G. P., & Tiano, L. (2007). Bioenergetic and antioxidant properties of coenzyme Q10: Recent developments. *Molecular Biotechnology*, 37(1), 31–37. <https://doi.org/10.1007/s12033-007-0052-y>
- Macías García, B., González Fernández, L., Ortega Ferrusola, C., Salazar-Sandoval, C., Morillo Rodríguez, a., Rodríguez Martínez, H., ... Peña, F. J. (2011). Membrane Lipids of the Stallion Spermatozoon in Relation to Sperm Quality and Susceptibility to Lipid Peroxidation. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(1), 141–148. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01609.x>
- Masoudi, R., Sharafi, M., Zare Shahneh, A., Kohram, H., Nejati-Amiri, E., Karimi, H., ... Shahverdi, A. (2018). Supplementation of extender with coenzyme Q10 improves the function and fertility potential of rooster spermatozoa after cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, 198(June), 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.09.019>
- Newcombe, J., & Cuervo-Arango, J. (2011). The Effect of Time of Insemination With Fresh Cooled Transported Semen and Natural Mating Relative to Ovulation on Pregnancy and Embryo Loss Rates in the Mare. *Reproduction in Domestic Animals*, Vol. 46, pp. 678–681. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01728.x>
- Nogueira, B. G., Sampaio, B. F. B., Souza, M. I. L., Costa e Silva, E. V., & Zúccari, C. E. S. N. (2015). Coenzyme Q10 and  $\alpha$ -Tocopherol Prevent the Lipid Peroxidation of Cooled Equine Semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(6), 1003–1010. <https://doi.org/10.1111/rda.12627>
- O'Flaherty, C. (2015). Redox regulation of mammalian sperm capacitation. *Asian Journal of Andrology*, 17(4), 583–590. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.153303>
- Ortega Ferrusola, C., González Fernández, L., Macías García, B., Salazar-Sandoval, C., Morillo Rodríguez, a, Rodríguez Martínez, H., ... Peña, F. J. (2009). Effect of cryopreservation on nitric oxide production by stallion spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 81(6), 1106–1111. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.078220>
- Paradies, G., Paradies, V., Ruggiero, F. M., & Petrosillo, G. (2017). Mitochondrial bioenergetics decay in aging: beneficial effect of melatonin. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(21), 3897–3911. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2619-5>
- Patel, S. R., & Sigman, M. (2008). Antioxidant Therapy in Male Infertility. *Urologic Clinics of North America*, 35(2), 319–330. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2008.01.009>
- Peña, F., Plaza Davila, M., Ball, B., Squires, E., Martin Muñoz, P., Ortega Ferrusola, C., & Balao da Silva, C. (2015). The Impact of Reproductive Technologies on Stallion Mitochondrial Function. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(4), 529–537. <https://doi.org/10.1111/rda.12551>
- Reiter, R. J., Tamura, H., Tan, D. X., & Xu, X. Y. (2014). Melatonin and the circadian system: Contributions to successful female reproduction. *Fertility and Sterility*, 102(2), 321–328. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.06.014>

- Reiter, R. J., Tan, D.-X., Mayo, J. C., Sainz, R. M., Leon, J., & Czarnecki, Z. (2003). Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans. *Acta Biochimica Polonica*, *50*(4), 1129–1146. <https://doi.org/0350041129>
- Reiter, R., Tang, L., Garcia, J. J., & Muñoz-Hoyos, A. (1997). Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sciences*, *60*(25), 2255–2271. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(97\)00030-1](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(97)00030-1)
- Sampaio, B. F. B., Nogueira, B. G., Souza, M. I. L., Silva, E. V. da C. e., & Zúccari, C. E. S. N. (2018). Effects of ascorbic acid 2-glucoside and alpha-tocopherol on the characteristics of equine spermatozoa stored at 5°C. *Animal Science Journal*, *89*(10), 1415–1423. <https://doi.org/10.1111/asj.12944>
- Si, Y., & Olds-Clarke, P. (2000). Evidence for the Involvement of Calmodulin in Mouse Sperm Capacitation1. *Biology of Reproduction*, *62*(5), 1231–1239. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.5.1231>
- Sieme, H., Oldenhof, H., & Wolkers, W. F. (2015). Sperm Membrane Behaviour during Cooling and Cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, *50*, 20–26. <https://doi.org/10.1111/rda.12594>
- Talevi, R., Barbato, V., Fiorentino, I., Braun, S., Longobardi, S., & Gualtieri, R. (2013). Protective effects of in vitro treatment with zinc, d-aspartate and coenzyme q10 on human sperm motility, lipid peroxidation and DNA fragmentation. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, *11*(1), 81. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-11-81>
- Tan, D. X., Manchester, L. C., Liu, X., Rosales-Corral, S. a., Acuna-Castroviejo, D., & Reiter, R. J. (2013). Mitochondria and chloroplasts as the original sites of melatonin synthesis: A hypothesis related to melatonin's primary function and evolution in eukaryotes. *Journal of Pineal Research*, *54*(2), 127–138. <https://doi.org/10.1111/jpi.12026>
- Turunen, M., Olsson, J., & Dallner, G. (2004). Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1660*(1–2), 171–199. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2003.11.012>
- Valença, R. M. B., & Guerra, M. M. P. (2007). Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, *31*(1), 47–53.
- Varner, D. D., Gibb, Z., & Aitken, R. J. (2014). Stallion fertility: A focus on the spermatozoon. *Equine Veterinary Journal*, 1–37. <https://doi.org/10.1111/evj.12308>
- Venegas, C., García, J. a., Escames, G., Ortiz, F., López, A., Doerrier, C., ... Acuña-Castroviejo, D. (2012). Extrapineal melatonin: Analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. *Journal of Pineal Research*, *52*(2), 217–227. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2011.00931.x>
- Watson, P. F. (1976). The protection of ram and bull spermatozoa by the low density lipoprotein fraction of egg yolk during storage at 5°C and deep-freezing. *Journal of Thermal Biology*, *1*(3), 137–141. [https://doi.org/10.1016/0306-4565\(76\)90003-6](https://doi.org/10.1016/0306-4565(76)90003-6)

- Yousefian, I., Zare-Shahneh, A., & Zhandi, M. (2014). The Effect of Coenzyme Q10 and  $\alpha$ -Tocopherol in Skim Milk–Based Extender for Preservation of Caspian Stallion Semen in Cool Condition. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34(8), 949–954. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2014.04.002>
- Zhang, H. M., & Zhang, Y. (2014). Melatonin: A well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. *Journal of Pineal Research*, 131–146. <https://doi.org/10.1111/jpi.12162>

O artigo foi redigido conforme normas de publicação do periódico *Reproduction in Domestic Animals*, e portanto, de acordo com a American Psychological Association, Sixth Edition; disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/14390531/homepage/forauthors.html> e <https://apastyle.apa.org/manual/>

## CAPÍTULO 3

### ARTIGO 2

#### **OZÔNIO PRESERVA A INTEGRIDADE DAS MEMBRANAS PLASMÁTICA E ACROSSOMAL NA CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN EQUINO**

**BG Nogueira<sup>1</sup>, JL Bitencourt<sup>2</sup>, B Milan<sup>3</sup>, WVA Reis<sup>3</sup>, RR Pereira<sup>3</sup>, MV Junior<sup>3</sup>, BR Acácio<sup>4</sup>, BFB Sampaio<sup>5</sup>, MIL Souza<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – FAMEZ / UFMS

<sup>2</sup>Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – FAMEZ / UFMS

<sup>3</sup>Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – FAMEZ / UFMS

<sup>4</sup>Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS

<sup>5</sup>Professor Doutor da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – FAMEZ / UFMS

E-mail: [maria.souza@ufms.br](mailto:maria.souza@ufms.br)

**RESUMO** – A criopreservação do sêmen equino é uma biotécnica de grande valor para a equideocultura. Contudo, tal procedimento está relacionado com o aumento da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), estresse oxidativo e redução da fertilidade do sêmen criopreservado. Neste contexto, as pesquisas são direcionadas para a adição de diferentes antioxidantes na tentativa de redução dos efeitos nocivos ocasionados pelo estresse oxidativo. Recentemente, a aplicação de estressores, de forma controlada, tem sido descrita para ativação de uma resposta temporária em células espermáticas. Os objetivos deste trabalho foram identificar a dose sub-letal de estresse oxidativo e o efeito do mesmo, através da utilização do ozônio, sobre a manutenção das

variáveis espermáticas, e a eficácia do mesmo na prevenção da lipoperoxidação do sêmen equino, ao longo do processo de criopreservação e durante incubação por 60 minutos a 37°C, pós-descongelação. Foram utilizados cinco garanhões adultos de fertilidade comprovada, obtendo-se quatro ejaculados por reprodutor, submetendo-os aos seguintes tratamentos: Controle (sêmen *in natura*), ozônio 2 µg/mL (O<sub>3</sub>-2), ozônio 15 µg/mL (O<sub>3</sub>-15), ozônio 30 µg/mL (O<sub>3</sub>-30), ozônio 61 µg/mL (O<sub>3</sub>-61). O grupo O<sub>3</sub>-15 preservou o maior percentual de espermatozoides com motilidade progressiva pós-descongelação, sendo significativamente superior aos demais grupos ( $p < 0,05$ ), exceto quando comparado ao grupo O<sub>3</sub>-2 ( $p > 0,05$ ). O maior percentual de espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal íntegras foi obtido pelo grupo O<sub>3</sub>-2 em todos os momentos avaliados, sendo significativamente superior aos demais tratamentos ( $p < 0,05$ ). Conclui-se que o ozônio pode trazer benefícios à criopreservação do sêmen equino em dose dependente, ao promover maior percentual de células com motilidade progressiva e com integridade de membranas plasmática e acrossomal.

**Palavras-chave:** espermatozoide, estresse oxidativo, garanhão, oxidantes, peroxidação lipídica, ROS

**CONTENT** – Equine's semen cryopreservation is a biotechnology of great value for equine industry. However, this procedure is related to increased generation of reactive oxygen species (ROS), oxidative stress and reduced fertility. In this context, research is directed to different antioxidants addition in an attempt to reduce the harmful oxidative stress effects. Recently, the application of stressors in a controlled manner has been described to activate a temporary response in sperm cells. The objectives of this work were to identify the sublethal dose of oxidative stress and its effect, using ozone, on the maintenance of sperm variables, and its effectiveness in preventing equine semen lipoperoxidation throughout the process. cryopreservation and during incubation for 60 minutes at 37°C after thawing. Five adult stallions of proven fertility were used, obtaining four ejaculations per breeder, subjecting them to the following treatments: Control (fresh semen), ozone 2 µg / mL (O<sub>3</sub>-2), ozone 15 µg / mL (O<sub>3</sub>- 15), 30 µg / mL

ozone (O<sub>3</sub>-30), 61 µg / mL ozone (O<sub>3</sub>-61). O<sub>3</sub>-15 group preserved the highest percentage of sperm with progressive motility after thawing, being significantly higher than the other groups ( $p < 0.05$ ), except when compared to group O<sub>3</sub>-2 ( $p > 0.05$ ). The highest percentage of sperm with intact plasma and acrosomal membranes was always obtained by O<sub>3</sub>-2 group, being significantly higher than the other treatments ( $p < 0.05$ ). It is concluded that ozone may bring benefits to equine semen cryopreservation in a dose-dependent manner, by promoting a higher percentage of cells with progressive motility and integrity of plasma and acrosomal membranes.

## INTRODUÇÃO

A criopreservação do sêmen é uma biotécnica de grande importância para a equideocultura, ao permitir a difusão de material genético, tanto no mercado nacional como mundial, bem como a preservação de gametas por tempo indeterminado, até mesmo após o óbito do reprodutor. No entanto, o processo de congelação e descongelação pode causar lesões irreversíveis ao espermatozoide, contribuindo significativamente para a redução da fertilidade (Moraes et al., 2015), além dos resultados desta tecnologia apresentarem grande variação entre indivíduos (Sieme et al., 2015).

Dentre os pontos críticos do processo, destacam-se o forte estresse osmótico ao qual as células espermáticas são submetidas (Sieme et al., 2015), exposição às baixas temperaturas, determinando a mudança de fase e reorganização dos fosfolípidios da membrana plasmática (MP) (Amann & Pickett, 1987; Moraes et al., 2015) e aumento da produção das espécies reativas de oxigênio (ROS), levando à peroxidação lipídica (LPO; Peña et al., 2015). Este último ponto é de grande importância para os equinos, uma vez que perdem sua defesa natural de antioxidantes, através da retirada do plasma seminal, como parte rotineira da metodologia de criopreservação (Ball, 2008).

Assim, diversos estudos vêm acrescentando antioxidantes aos meios diluidores na tentativa de atenuar ou, até mesmo, neutralizar os efeitos nocivos das ROS (Izadpanah et al., 2015; Nogueira et al., 2015; Carneiro et al., 2018; Lançoni et al., 2018; Masoudi et al., 2018; Sampaio et al., 2018). No entanto,

todo esse conceito vem sendo desafiado por novas evidências, demonstrando que a exposição a níveis controlados de estresse pode ser benéfica à sobrevivência espermática, ao proporcionar uma maior resistência a futuros estresses (Leahy & Gadella, 2011; Sharafi et al., 2015).

Neste contexto, uma molécula, em especial, vem despertando a atenção, tanto na medicina humana como na medicina veterinária, o ozônio ( $O_3$ ). Apesar do  $O_3$  não ser considerado um radical livre, ele é classificado como um dos mais potentes agentes oxidantes, sendo capaz de gerar ROS, comumente produzidas através do oxigênio durante a respiração mitocondrial (Bocci et al., 2009). Em fluidos biológicos, este reage com biomoléculas e dissocia-se em uma molécula de  $O_2$  e um átomo extremamente reativo, o oxigênio atômico ( $O\cdot$ ). Assim, uma pequena e bem ajustada dose de  $O_3$ , pode desencadear vários mecanismos bioquímicos úteis e reativar o sistema antioxidante de defesa celular (Bocci, 2006; Zanardi et al., 2016).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi buscar a dose sub-letal de estresse oxidativo, induzido através da utilização do ozônio, bem como verificar se, tal fato, seria benéfico para a manutenção das variáveis espermáticas, na prevenção da lipoperoxidação do sêmen equino, ao longo do processo de criopreservação e durante incubação por 60 minutos a  $37^\circ\text{C}$ , pós-descongelamento. Ressalta-se que este é um estudo pioneiro e, até o presente momento, não foi encontrada nenhuma publicação relacionada à utilização do ozônio e seus efeitos na célula espermática, em nenhuma espécie animal.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS**

O experimento foi realizado no Laboratório Multiusuário de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sendo o projeto de pesquisa autorizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o número 913/2017. Utilizaram-se quatro ejaculados de cinco garanhões adultos ( $n = 20$ ),

com fertilidade comprovada, com idades entre 6 e 17 anos, alojados em propriedades próximas a Campo Grande/MS.

As concentrações de O<sub>3</sub> utilizadas neste experimento foram escolhidas através de estudo piloto realizado com quatro garanhões e um ejaculado de cada, objetivando-se buscar o máximo de informações com escala ampla de dosagens, afim de se identificar a dose sub-letal, uma vez que não há dados na literatura sobre os efeitos do ozônio nas células espermáticas. Desta forma, formou-se cinco grupos experimentais: Controle (sêmen *in natura*), ozônio 2 µg/mL (O<sub>3</sub>-2), ozônio 15 µg/mL (O<sub>3</sub>-15), ozônio 30 µg/mL (O<sub>3</sub>-30), ozônio 61 µg/mL (O<sub>3</sub>-61). Para a produção do O<sub>3</sub>, utilizou-se o gerador comercial O&L 1.5 portátil® (Ozone & Life, São José dos Campos, São Paulo, Brasil).

### **COLHEITA E TRANSPORTE DO SÊMEN**

Realizaram-se quatro colheitas de sêmen por garanhão (n=20), utilizando vagina artificial modelo Botucatu (Botupharma, Botucatu, São Paulo, Brasil), mantida a uma temperatura entre 42 e 45°C, com o auxílio de uma fêmea em estro ou manequim, durante os meses de maio a julho de 2018.

O ejaculado foi mantido em banho-maria a 37°C durante as análises da motilidade subjetiva (0-100%) e vigor (escore 0-5). Somente ejaculados com motilidade ≥ 70% e vigor ≥ 3 prosseguiram à congelação. Após a colheita e avaliação seminal, diluiu-se uma alíquota contendo 1,5 x 10<sup>9</sup> espermatozoides em Botusêmen® (Botupharma, Botucatu, São Paulo, Brasil), obtendo-se uma concentração de 50 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL. O sêmen foi transportado para o laboratório em contêiner a 15°C (Botu-Flex®, Botupharma, Botucatu, São Paulo, Brasil), com uso de apenas um gelo reciclável, em intervalo ≤ 1 hora após a colheita.

### **PROCESSAMENTO E CONGELAÇÃO DO SÊMEN**

Na chegada ao laboratório centrifugou-se o sêmen a 600xg por 10 minutos (Fanem Baby, Guarulhos, São Paulo, Brasil). O sobrenadante foi desprezado e os *pellets* ressuspendidos com o diluente de congelação Botucrio® (Botupharma, Botucatu, São Paulo, Brasil), a uma concentração de 200 x 10<sup>6</sup>

espermatozoides/mL. Dividiu-se os  $1,5 \times 10^9$  espermatozoides em cinco criotubos, nos quais foram acrescentadas as diferentes concentrações de ozônio, de acordo com cada grupo experimental.

Envasou-se o sêmen em três palhetas de 0,5 mL, de cada tratamento, em uma concentração de  $100 \times 10^6$  espermatozoides por palheta. Após o envase, as palhetas foram colocadas em bandeja específica para congelação, e, passaram pelo período de estabilização, mantidas a 5°C por 20 minutos, transferindo-se as palhetas para uma caixa térmica contendo nitrogênio líquido e mantidas no vapor de nitrogênio por 20 minutos, a 6 cm acima do nível do nitrogênio líquido. Após este período, as palhetas foram imersas no nitrogênio líquido, e, então, armazenadas em raques e estocadas em botijão criogênico a -196°C.

## **ANÁLISE DO SÊMEN**

As avaliações seminais foram realizadas antes da congelação (PRÉ), imediatamente após descongelação a 37°C por 30 segundos, (M-0) e nos momentos: M-30 = após 30 minutos e M-60= após 60 minutos de incubação a 37°C. Descongelou-se uma palheta de cada tratamento, submetendo-a às seguintes análises: cinética espermática (Sperm Class Analyzer, SCA<sup>®</sup>, Microptic, Barcelona, Espanha), integridade de membrana plasmática e acrossomal, fluidez de membrana (indicativo de capacitação espermática), atividade mitocondrial e suscetibilidade à lipoperoxidação, por citometria de fluxo (CitoFLEX<sup>®</sup>, Beckman Coulter, Brea, Califórnia, EUA), fazendo-se a contagem de, pelo menos, 10.000 células/amostra. Os gráficos gerados a partir dos resultados da citometria de fluxo, utilizados para todas as análises, foram *dot-plots* bi-exponenciais, corretamente compensados.

## **CINÉTICA ESPERMÁTICA**

A cinética espermática foi avaliada de forma objetiva pelo sistema computadorizado CASA (Sperm Class Analyzer, SCA<sup>®</sup>, Microptic, Barcelona, Espanha). Para a avaliação da mesma, 5,0 µL de sêmen foram colocados na câmara de Makler<sup>®</sup> (Sefi Medical Instruments, Haifa, Israel) previamente

aquecida a 37°C e o aparelho calibrado conforme as recomendações do fabricante para análise de sêmen equino. Avaliaram-se, aleatoriamente, no mínimo cinco campos por amostra, quanto aos seguintes parâmetros de cinética espermática: motilidade total (MT, %) e motilidade progressiva (MP, %).

### **MEMBRANA PLASMÁTICA, ACROSSOMAL E POTENCIAL MITOCONDRIAL**

Para a avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal e do potencial de membrana mitocondrial, foi utilizada a associação das sondas fluorescentes, Hoechst 33342 (H342), iodeto de propídio (PI), FITC-PNA (aglutinina de amendoim, conjugada ao isotiocianato de fluoresceína) e MitoStatus Red (MST), conforme protocolo descrito por Freitas-Dell'Aqua et al. (2012) e modificado por Camargo (2017).

Diluiu-se 200 µL de sêmen em TALP-PVA, contendo 7 µM de H342, 1,5 µM de PI, 2 ng de FITC-PNA e 20 nM de MST, na concentração de  $5 \times 10^6$  espermatozoides/mL, e, incubou-se por 20 minutos a 37°C ao abrigo da luz. Posteriormente ao período de incubação, a amostra prosseguiu para avaliação em citometria de fluxo.

### **FLUIDEZ DE MEMBRANA (CAPACITAÇÃO ESPERMÁTICA)**

Os estágios iniciais da capacitação espermática podem ser medidos pela sonda Merocianina 540, especialmente quando associados com a sonda YO-PRO e Hoechst 33342. Este corante tem característica hidrofóbica, que pode monitorar o grau de estabilidade da membrana pelo padrão dos fosfolipídeos apresentados em sua superfície. No processo de capacitação espermática ocorre a inversão dos folhetos interno e externo da membrana plasmática; desta forma, quanto maior a intensidade da fluorescência, maior o grau de desestabilização da membrana.

As amostras de sêmen foram diluídas em TALP-PVA à concentração de  $5 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Em 200 µL dessa solução acrescentou-se: 7 µM de Hoechst 33342, 7,5 µM de Merocianina (M24571 – Life Technologies) e 25 nM de Yo-Pro (YP, Y3603 – Life Technologies) e incubou-se por 20 minutos a 37°C ao abrigo da luz (Freitas-Dell'Aqua et al., 2012)

## **PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA OU LIPOPEROXIDAÇÃO (LPO)**

Para a peroxidação lipídica, utilizou-se protocolo de acordo com Guasti et al. (2012), utilizando-se a sonda C11-BODYPY (D-3861; Molecular Probes). Esta sonda possui uma alta sensibilidade de fluorescência e é um análogo de ácidos graxos poli-insaturados, que se incorpora na membrana celular. Enquanto este fluorocromo está intacto, é observada uma fluorescência vermelha e, com a sua peroxidação, há uma mudança de fluorescência para verde.

Para realização do protocolo, diluiu-se 500 µL de sêmen em TALP-PVA e adicionou-se 5 µM de C11-BODIPY<sup>581/591</sup>, seguido por incubação durante 30 minutos a 37°C. Após a incubação, foram realizadas duas lavagens consecutivas através de centrifugação a 300xg por 5 minutos, com TALP-PVA, sendo o *pellet* ressuspenso em 500 µL de TALP-PVA.

## **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

O delineamento experimental foi em parcelas subdivididas, considerando-se a adição do ozônio (O<sub>3</sub>) como tratamento e os momentos de avaliação como sub-parcelas. Para comparar as variáveis dependentes (motilidade, integridade da membrana plasmática, acrossomal, capacitação espermática, atividade mitocondrial e lipoperoxidação) foi utilizada a análise de variância, pelo procedimento GLM do Programa Estatístico SAS (2001), considerando-se os efeitos fixos de tratamento e momentos de avaliação seminal. Compararam-se as médias pelo teste de *Duncan*, em nível de 5% de significância. As variáveis expressas em porcentagem foram transformadas em arco seno (x/100), de acordo com o sugerido por Sampaio (2007).

## **RESULTADOS**

Os valores médios das variáveis seminais pré-congelação foram: motilidade total - 82,3 ± 2,6%; motilidade progressiva - 70,8 ± 2,7%; membranas plasmática e acrossomal íntegras - 64,5 ± 4,0%; membrana plasmática íntegra com alto potencial de membrana mitocondrial - 64,5 ± 7,5%; membrana plasmática íntegra e não capacitados - 57,4 ± 3,0% e nível de lipoperoxidação de 7705,3 ± 520,5

(intensidade de fluorescência – unidades arbitrárias). Ao longo do processo de criopreservação, e do tempo de incubação (tabelas 1 para M-0, 2 para M-30 e 3 para M-60), houve queda de todos valores médios das variáveis espermáticas analisadas, exceto para o grau de peroxidação lipídica, que aumentou.

Não houve diferença, entre os grupos controle, O<sub>3</sub>-2 e O<sub>3</sub>-15 no percentual de células móveis em todos os momentos avaliados ( $p > 0,05$ ). O grupo O<sub>3</sub>-61 apresentou os menores valores de motilidade total ao longo de 60 minutos de incubação ( $p < 0,05$ ).

O grupo O<sub>3</sub>-15 apresentou o maior percentual de espermatozoides com motilidade progressiva imediatamente pós-descongelção, sendo significativamente superior ( $p < 0,05$ ) aos grupos controle, O<sub>3</sub>-30, O<sub>3</sub>-61, contudo, sem diferir ( $p > 0,05$ ) do grupo O<sub>3</sub>-2, conforme demonstrado na tabela 1. Tal resultado não se manteve ao longo do período de incubação (tabelas 2 e 3).

A concentração de 2 µg/mL de ozônio resultou em maior população espermática com membranas acrossomal e plasmática íntegras, sendo superior aos demais tratamentos em todos os momentos avaliados ( $p < 0,05$ ) exceto quando comparada ao grupo O<sub>3</sub>-15 no M-60 ( $p > 0,05$ ).

Em relação ao percentual de células com membranas íntegras e alto potencial de membrana mitocondrial, não houve diferença entre os tratamentos avaliados, exceto pelo grupo O<sub>3</sub>-61, em todos os momentos e O<sub>3</sub>-30 no M-60 (tabela 3), que apresentaram menor percentual de células com alto potencial de membrana mitocondrial ( $p < 0,05$ ).

O grupo O<sub>3</sub>-2 apresentou maior percentual de estabilidade de membrana plasmática, sendo um indicativo de população espermática não capacitada, mas sem diferir estatisticamente dos grupos controle e O<sub>3</sub>-15 no M-0 e M-30 (tabelas 1 e 2) e somente do controle no M-60 (tabela 3).

A LPO foi significativamente maior nos grupos O<sub>3</sub>-30 e O<sub>3</sub>-61 em todos os momentos avaliados ( $p < 0,05$ ), comparando-se aos demais tratamentos. O grupo O<sub>3</sub>-2 apresentou o menor nível de LPO, tanto pós-descongelção quanto ao longo do período de incubação; no entanto, não diferiu estatisticamente do controle e do O<sub>3</sub>-15.

Tabela 1. Valores médios ( $\pm$  erro padrão) das variáveis espermáticas pós-descongelção do sêmen equino com diferentes concentrações de ozônio, Campo Grande, MS

Variável	Pós-descongelção (M-0)				
	Controle	O <sub>3</sub> -2	O <sub>3</sub> -15	O <sub>3</sub> -30	O <sub>3</sub> -61
MT (%)	41,3 $\pm$ 3,9 <sup>a</sup>	44,4 $\pm$ 2,6 <sup>a</sup>	44,0 $\pm$ 3,9 <sup>a</sup>	34,0 $\pm$ 3,5 <sup>b</sup>	24,0 $\pm$ 2,5 <sup>c</sup>
MP (%)	29,7 $\pm$ 2,6 <sup>b</sup>	32,0 $\pm$ 2,5 <sup>ab</sup>	34,1 $\pm$ 3,1 <sup>a</sup>	26,2 $\pm$ 3,2 <sup>b</sup>	15,1 $\pm$ 1,8 <sup>c</sup>
MIAI (%)	36,3 $\pm$ 3,5 <sup>b</sup>	43,5 $\pm$ 5,0 <sup>a</sup>	34,0 $\pm$ 3,9 <sup>b</sup>	31,3 $\pm$ 3,9 <sup>bc</sup>	24,8 $\pm$ 2,3 <sup>c</sup>
MI/AltoPMM (%)	61,3 $\pm$ 10,2 <sup>a</sup>	60,9 $\pm$ 11,4 <sup>a</sup>	55,2 $\pm$ 10,5 <sup>ab</sup>	54,2 $\pm$ 11,9 <sup>ab</sup>	49,8 $\pm$ 11,4 <sup>b</sup>
MI/N-CAP (%)	35,9 $\pm$ 5,9 <sup>ab</sup>	39,6 $\pm$ 6,2 <sup>a</sup>	31,1 $\pm$ 6,5 <sup>ab</sup>	26,5 $\pm$ 5,8 <sup>b</sup>	20,6 $\pm$ 4,7 <sup>c</sup>
LPO	9858,0 $\pm$ 1066,7 <sup>ab</sup>	8996,4 $\pm$ 412,3 <sup>a</sup>	9423,2 $\pm$ 557,6 <sup>ab</sup>	10193,8 $\pm$ 516,3 <sup>b</sup>	10246,1 $\pm$ 577,4 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Letras diferentes na linha indicam diferença entre médias pelo teste de Duncan (P<0,05)

MT – motilidade total; MP – motilidade progressiva; MI – membrana plasmática íntegra; AI – acrossoma íntegro; N-CAP – não capacitado; Alto PMM – alto potencial de membrana mitocondrial; LPO (BODIPY C<sub>11</sub>) – peroxidação lipídica, resultados expressos em intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias); O<sub>3</sub>-2= ozônio 2  $\mu$ g/mL; O<sub>3</sub>-15= ozônio 15  $\mu$ g/mL; O<sub>3</sub>-30 = ozônio 30  $\mu$ g/mL; O<sub>3</sub>-61= ozônio 61  $\mu$ g/mL

Tabela 2. Valores médios ( $\pm$  erro padrão) das variáveis espermáticas pós-incubação por 30 minutos a 37°C do sêmen equino com diferentes concentrações de ozônio, Campo Grande, MS

Variável	Pós-incubação por 30 minutos (M-30)				
	Controle	O <sub>3</sub> -2	O <sub>3</sub> -15	O <sub>3</sub> -30	O <sub>3</sub> -61
MT (%)	32,2 $\pm$ 2,9 <sup>a</sup>	30,5 $\pm$ 1,9 <sup>ab</sup>	34,1 $\pm$ 2,9 <sup>a</sup>	27,0 $\pm$ 3,8 <sup>b</sup>	9,1 $\pm$ 2,9 <sup>c</sup>
MP (%)	20,5 $\pm$ 2,4 <sup>a</sup>	20,1 $\pm$ 1,9 <sup>a</sup>	22,1 $\pm$ 2,2 <sup>a</sup>	18,36 $\pm$ 2,8 <sup>a</sup>	4,6 $\pm$ 1,7 <sup>b</sup>
MIAI (%)	35,3 $\pm$ 2,9 <sup>b</sup>	41,0 $\pm$ 3,7 <sup>a</sup>	32,2 $\pm$ 2,8 <sup>b</sup>	29,3 $\pm$ 4,9 <sup>bc</sup>	20,5 $\pm$ 3,3 <sup>c</sup>
MI/AltoPMM (%)	55,1 $\pm$ 10,0 <sup>a</sup>	59,3 $\pm$ 11,1 <sup>a</sup>	54,6 $\pm$ 11,7 <sup>a</sup>	49,5 $\pm$ 11,7 <sup>ab</sup>	42,1 $\pm$ 12,2 <sup>b</sup>
MI/N-CAP (%)	33,1 $\pm$ 6,6 <sup>ab</sup>	37,6 $\pm$ 6,9 <sup>a</sup>	29,2 $\pm$ 7,5 <sup>ab</sup>	24,6 $\pm$ 6,9 <sup>b</sup>	17,1 $\pm$ 7,0 <sup>c</sup>
LPO	10357,6 $\pm$ 509,9 <sup>a</sup>	9176,5 $\pm$ 580,4 <sup>a</sup>	10465,5 $\pm$ 669,7 <sup>a</sup>	11279,0 $\pm$ 495,2 <sup>b</sup>	12174,6 $\pm$ 501,3 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> Letras diferentes na linha indicam diferença entre médias pelo teste de Duncan ( $P < 0,05$ )

MT – motilidade total; MP – motilidade progressiva; MI – membrana plasmática íntegra; AI – acrossoma íntegro; N-CAP – não capacitado; Alto PMM – alto potencial de membrana mitocondrial; LPO (BODIPY C<sub>11</sub>) – peroxidação lipídica, resultados expressos em intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias); O<sub>3</sub>-2= ozônio 2  $\mu$ g/mL; O<sub>3</sub>-15= ozônio 15  $\mu$ g/mL; O<sub>3</sub>-30 = ozônio 30  $\mu$ g/mL; O<sub>3</sub>-61= ozônio 61  $\mu$ g/mL

Tabela 3. Valores médios ( $\pm$  erro padrão) das variáveis espermáticas pós-incubação por 60 minutos a 37°C do sêmen equino com diferentes concentrações de ozônio, Campo Grande, MS

Variável	Pós-incubação por 60 minutos (M-60)				
	Controle	O <sub>3</sub> -2	O <sub>3</sub> -15	O <sub>3</sub> -30	O <sub>3</sub> -61
MT (%)	21,3 $\pm$ 2,2 <sup>a</sup>	22,5 $\pm$ 3,4 <sup>a</sup>	16,1 $\pm$ 4,5 <sup>ab</sup>	13,6 $\pm$ 3,3 <sup>b</sup>	4,7 $\pm$ 1,9 <sup>c</sup>
MP (%)	13,5 $\pm$ 2,1 <sup>a</sup>	15,0 $\pm$ 2,6 <sup>a</sup>	10,0 $\pm$ 2,4 <sup>ab</sup>	10,4 $\pm$ 3,0 <sup>ab</sup>	1,54 $\pm$ 0,8 <sup>c</sup>
MIAI (%)	31,4 $\pm$ 5,4 <sup>b</sup>	39,0 $\pm$ 7,0 <sup>a</sup>	28,4 $\pm$ 4,7 <sup>b</sup>	20,6 $\pm$ 7,3 <sup>c</sup>	13,5 $\pm$ 6,5 <sup>d</sup>
MI/AltoPMM (%)	53,1 $\pm$ 10,6 <sup>a</sup>	56,2 $\pm$ 12,0 <sup>a</sup>	47,3 $\pm$ 12,1 <sup>ab</sup>	43,6 $\pm$ 12,0 <sup>b</sup>	32,1 $\pm$ 12,3 <sup>c</sup>
MI/N-CAP (%)	31,3 $\pm$ 6,5 <sup>ab</sup>	35,8 $\pm$ 8,0 <sup>a</sup>	24,7 $\pm$ 8,3 <sup>b</sup>	20,7 $\pm$ 8,1 <sup>bc</sup>	12,7 $\pm$ 7,7 <sup>c</sup>
LPO	11209,7 $\pm$ 717,1 <sup>a</sup>	10754,0 $\pm$ 473,1 <sup>a</sup>	11593,7 $\pm$ 706,5 <sup>a</sup>	12575,7 $\pm$ 321,5 <sup>b</sup>	13838,2 $\pm$ 686,5 <sup>c</sup>

<sup>a,b</sup> Letras diferentes na linha indicam diferença entre médias pelo teste de Duncan (P<0,05)

MT – motilidade total; MP – motilidade progressiva; MI – membrana plasmática íntegra; AI – acrossoma íntegro; N-CAP – não capacitado; Alto PMM – alto potencial de membrana mitocondrial; LPO (BODIPY C<sub>11</sub>) – peroxidação lipídica, resultados expressos em intensidade de fluorescência (unidades arbitrárias); O<sub>3</sub>-2= ozônio 2 µg/mL; O<sub>3</sub>-15= ozônio 15 µg/mL; O<sub>3</sub>-30 = ozônio 30 µg/mL; O<sub>3</sub>-61= ozônio 61 µg/mL

## DISCUSSÃO

A criopreservação do sêmen equino é uma estratégia crucial, tanto para a preservação por tempo indeterminado do material genético de um garanhão, quanto para a facilitação na disseminação do mesmo (Peña et al., 2015). Contudo, a referida biotécnica causa diferentes tipos de danos aos espermatozoides, decorrentes do choque térmico ao frio, choque osmótico e estresse oxidativo, além da formação de cristais de gelo, tanto intra quanto extracelularmente (Baumber et al., 2003; Burnaugh et al., 2010). Tais lesões resultam em LPO, pela produção excessiva de ROS, disfunção mitocondrial, depleção do sistema de reserva intracelular de ATP, lesões irreversíveis nas membranas plasmática e acrossomal e queda acentuada da motilidade espermática (Darr et al., 2016), podendo levar a apoptose (Casao et al., 2010) e comprometer diretamente o potencial fecundante do espermatozoide (Büyükleblebici et al., 2014; Hezavehei et al., 2019).

Até o momento, inúmeras tentativas foram implementadas à criopreservação a fim de evitar ou reduzir lesões biofísicas e bioquímicas nos espermatozoides (Dodaran et al., 2015; Hezavehei et al., 2019). Tais tentativas, normalmente, são voltadas para a adição de componentes e desenvolvimento de novos meios diluentes (Alvarenga et al., 2005; Ramires Neto et al., 2013; Talevi et al., 2013; Hartwig et al., 2014; Ramires Neto et al., 2014; Masoudi et al., 2018).

Para a proteção dos espermatozoides contra o estresse oxidativo, a principal abordagem nas pesquisas têm sido o uso de antioxidantes e crioprotetores alternativos (Aurich et al., 2007; Agarwal et al., 2014; Sharafi et al., 2015). Embora a administração oral de antioxidantes apresente resultados satisfatórios e aumente a capacidade antioxidante do espermatozoide (Safarinejad et al., 2012; Gharagozloo et al., 2016; Agarwal & Majzoub, 2017), a falta de permeabilidade das células espermáticas contra a maioria dessas substâncias reduz a eficácia dos mesmos durante a utilização *in vitro* (Hezavehei et al., 2019).

Diante disso, novas abordagens baseadas na indução do estresse oxidativo sub-letal antes da criopreservação, vêm sendo aplicadas para melhorar a crioresistência do espermatozoide (Hezavehei et al., 2019). A indução do estresse através de alta pressão hidrostática (HHP) já se mostrou eficaz na

criopreservação do sêmen de suínos (Pribenszky et al., 2011), assim como com a adição de agentes oxidantes, como óxido nítrico (NO), no sêmen de bovinos (Sharafi et al., 2015) e, recentemente, de humanos (Hezavehei et al., 2019), e etanol no sêmen de bovinos (Dodaran et al., 2015) Esta abordagem baseia-se em realizar um pré-condicionamento do espermatozoide a eventos estressores futuros, com ativação da resposta antioxidante celular e, conseqüentemente, criar maior resistência (Pribenszky & Vajta, 2011).

Baseado nesta abordagem, este experimento avaliou diferentes concentrações do pré-tratamento com ozônio, um agente oxidante, objetivando-se identificar a faixa sub-letal de estresse induzido e seus possíveis efeitos benéficos, na criopreservação do sêmen equino. Este é o primeiro relato na literatura a utilizar o O<sub>3</sub> *in vitro* em células espermáticas, independente da espécie animal. Foi delineado a fim de determinar a melhor concentração de O<sub>3</sub> que pudesse induzir o estresse sub-letal, conhecer os limites de tolerância do espermatozoide a esta molécula, bem como verificar os possíveis efeitos benéficos desta abordagem. Desta forma, a discussão será realizada tendo como base pesquisas que objetivaram induzir e alcançar o estresse sub-letal, independente da metodologia utilizada para tal.

A motilidade espermática é um atributo de extrema importância para predizer a capacidade fecundante de uma amostra (Dodaran et al., 2015; Battut et al., 2017), e é a variável mais afetada ao longo do processo de criopreservação, na qual, geralmente, existe um decréscimo de 50% desta variável após um ciclo de congelação/descongelação (Peña et al., 2009). Os resultados deste experimento demonstraram que as menores concentrações de O<sub>3</sub> utilizadas (2 µg/mL e 15 µg/mL), proporcionaram maior percentual de espermatozoides com motilidade progressiva imediatamente pós-descongelação. Estes resultados assemelham-se aos encontrados na literatura com a adição do NO, tanto ao sêmen de bovinos (Sharafi et al., 2015), quanto ao sêmen de humanos (Hezavehei et al., 2019), assim como na adição de etanol em bovinos (Dodaran et al., 2015).

Sabe-se que o espermatozoide equino é dependente da fosforilação oxidativa (OXPHOS), para a geração de ATP e, por conseqüência, a motilidade espermática depende da eficácia deste processo. Evidências recentes apontam

que maiores níveis de ROS estão associados ao maior percentual de motilidade e, até mesmo, à fertilidade do sêmen equino (Aitken et al, 2014; Gibb et al., 2014). Assim, acredita-se que o aumento controlado, dentro do limite de tolerância, dos níveis de ROS, possa ser responsável pela melhora desta variável espermática. As maiores concentrações de O<sub>3</sub> (30 µg/mL e 61 µg/mL), apresentaram queda significativa na motilidade total e progressiva, ratificando o papel nocivo das ROS, quando em excesso, e demonstrando o limite de tolerância do espermatozoide equino ao estresse induzido. Tais resultados também estão de acordo com a literatura citada anteriormente, em que as maiores concentrações NO e etanol, também resultaram em queda desta variável (Dodaran et al., 2015; Hezavehei et al., 2019; Sharafi et al., 2015).

Devido à alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) da membrana espermática, os espermatozoides são altamente sensíveis aos efeitos nocivos das ROS (Kothari et al., 2010), e sua produção é aumentada durante a criopreservação (Peña et al., 2015), com as lesões na membrana plasmática decorrentes da LPO sendo uma das principais consequências do estresse oxidativo (Aitken, 1995). Tal fato, associado à remoção do plasma seminal e, portanto, de praticamente todo o sistema de defesa antioxidante, para o processo de criopreservação, tornam o espermatozoide equino, extremamente sensível à congelação e aos efeitos nocivos da LPO decorrente do estresse oxidativo (Gibb & Aitken, 2016).

Este experimento demonstrou que o grupo O<sub>3</sub>-2 proporcionou o maior percentual de espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal íntegras, em todos os momentos avaliados. Na criopreservação do sêmen de bovinos, a indução do estresse controlado com o NO a 1 µM resultou, também, em maior percentual de células com MP íntegra, ainda que sem diferir na integridade acrossomal (Sharafi et al., 2015). A adição de etanol não resultou em aumento da integridade de MP do espermatozoide bovino, pós-descongelação (Dodaran et al., 2015).

Açúcares, gema de ovo, crioprotetores, aminoácidos e antioxidantes são componentes descritos na embalagem comercial do Botucrío<sup>®</sup>, diluente de congelação utilizado neste experimento. O tratamento com O<sub>3</sub> é capaz de induzir

o estresse oxidativo de forma transitória e leve, e uma de suas funções é ativar o sistema antioxidante de defesa celular (Biçer et al., 2018; Zanardi et al., 2016). Acredita-se que o maior percentual de membranas íntegras encontradas neste experimento, tenha resultado desta interação entre o O<sub>3</sub> e os antioxidantes presentes no diluente de congelação. Tal fato, torna-se ainda mais interessante, uma vez que o espermatozoide equino perde quase todo seu sistema antioxidante de defesa com a remoção quase total do plasma seminal.

As ROS também podem afetar a qualidade espermática através de alterações na função mitocondrial, tais como a síntese de ATP, homeostase do cálcio, transporte de metabólitos, indução de capacitação prematura e apoptose espermática (Baumber et al., 2000; Casao et al., 2010; Agarwal et al., 2014). O pré-tratamento com O<sub>3</sub>, nas concentrações testadas, não resultou em nenhum efeito benéfico significativo para o percentual de células com alto potencial de membrana mitocondrial e nem para estabilidade de membrana, indicando estágio de não capacitação. O grupo O<sub>3</sub>-2 apresentou maior percentual de células com tais características, contudo, não diferiu do grupo controle ( $p > 0,05$ ).

A indução do estresse sub-letal se mostrou eficaz na manutenção da atividade mitocondrial, através do sistema de HHP na criopreservação do sêmen de suínos (Pribenszky et al., 2010) e da adição do NO (Sharafi et al., 2015) e do etanol (Dodaran et al., 2015) na congelação do sêmen de bovinos. Contudo, há uma grande diferença entre as fontes estressoras, metodologias utilizadas, bem como espécie animal aplicada. Tais divergências podem explicar a variação nos resultados.

O estresse oxidativo é considerado a principal causa de infertilidade masculina, uma vez que as reações oxidativas em cadeia, oriundas da LPO, podem levar à peroxidação dos PUFAs da MP do espermatozoide, degradação de proteínas, danos ao DNA, capacitação espermática prematura, alterações nas vias de sinalização intracelular e, até mesmo, a apoptose da célula (Agarwal & Majzoub, 2017).

Diante dos resultados, observou-se que o O<sub>3</sub> na concentração de 2 µg/mL proporcionou menor nível de LPO, em todos os momentos avaliados, mas sem diferir do controle e do grupo O<sub>3</sub>-15 ( $p > 0,05$ ). As maiores concentrações se

mostraram tóxicas ao longo do processo de congelação e incubação por 60 minutos a 37°C, exibindo níveis de LPO, significativamente maiores ( $p < 0,05$ ). O NO a 1  $\mu\text{M}$  na criopreservação do sêmen de touros, resultou em maior produção de malondialdeído (MDA), um subproduto da LPO e utilizado para avaliação da mesma, quando comparado ao grupo controle e a menores concentrações de NO (0,01 e 0,1  $\mu\text{M}$ ). No entanto, tal concentração, proporcionou maior percentual de células móveis, MP íntegra e atividade mitocondrial (Sharafi et al., 2015). Assim, acredita-se ainda mais que possa ter ocorrido a interação do  $\text{O}_3$  com antioxidantes presentes no diluente de congelação, com conseqüente redução dos níveis de LPO.

A criopreservação do sêmen equino com a utilização do  $\text{O}_3$  demonstrou resultados interessantes, dependendo da dose utilizada. Uma vez que este é o primeiro trabalho sobre o assunto, ainda há uma extensa investigação a ser realizada. Diante da possível interação benéfica entre  $\text{O}_3$  e antioxidantes, seria interessante avaliar seus efeitos quando adicionado ao diluente de centrifugação, pois, neste momento, o plasma seminal ainda está presente e, conseqüentemente, há a presença de grande variedade de antioxidantes. Ainda neste contexto, uma outra possibilidade, seria a adição do ozônio a diluentes previamente acrescidos de antioxidantes, que já apresentam resultados benéficos conhecidos na literatura, como a coenzima Q10 e a melatonina.

Diante do exposto, conclui-se que o ozônio, em dose dependente, adicionado ao diluente de congelação, foi eficaz ao longo do processo de congelação/descongelação, bem como durante a incubação *in vitro* a 37°C por 60 minutos, preservando o maior percentual de espermatozoides com membranas plasmática e acrossomal íntegras.

## **AGRADECIMENTOS**

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001  
À Botupharma pela doação dos diluentes de congelação utilizados neste experimento.

## REFERÊNCIAS

- Agarwal, A., & Majzoub, A. (2017). Antioxidant therapy in idiopathic oligoasthenoteratozoospermia. *Indian Journal of Urology*, 33(3), 207–214. <https://doi.org/10.4103/iju.IJU>
- Agarwal, A., Durairajanayagam, D., & du Plessis, S. S. (2014). Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12(1), 112. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-112>
- Agarwal, A., Durairajanayagam, D., Halabi, J., Peng, J., & Vazquez-Levin, M. (2014). Proteomics, oxidative stress and male infertility. *Reproductive BioMedicine Online*, 29(1), 32–58. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2014.02.013>
- Aitken, R. J., Lambourne, S., & Gibb, Z. (2014). The john hughes memorial lecture: Aspects of sperm physiology-oxidative stress and the functionality of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34(1), 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2013.10.120>
- Aitken, R J. (1995). Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction, Fertility, and Development*, 7(4), 659–668. <https://doi.org/10.1071/RD9950659>
- Alvarenga, M. A., Papa, F. O., Landim-Alvarenga, F. C., & Medeiros, a. S. L. (2005). Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: A review. *Animal Reproduction Science*, 89(1-4 SPEC. ISS.), 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.07.001>
- Amann, R. P., & Pickett, B. W. (1987). Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, 7(3), 145–173. [https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(87\)80025-4](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(87)80025-4)
- Aurich, C., Seeber, P., & Müller-Schlösser, F. (2007). Comparison of different extenders with defined protein composition for storage of stallion spermatozoa at 5°C. *Reproduction in Domestic Animals*, 42(4), 445–448. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00828.x>
- Ball, B. A. (2008). Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science*, 107(3–4), 257–267. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.04.014>
- Battut, I. B., Kempfer, A., Lemasson, N., Chevrier, L., & Camugli, S. (2017). Prediction of the fertility of stallion frozen-thawed semen using a combination of computer-assisted motility analysis, microscopical observation and flow cytometry. *Theriogenology*, 97(April), 186–200. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.04.036>

- Baumber, J., Ball, B. A., Gravance, C. G., Medina, V., & Davies-Morel, M. C. (2000). The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. *Journal of Andrology*, *21*(6), 895–902. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb03420.x>
- Baumber, Julie, Ball, B. A., Linfor, J. J., & Meyers, S. A. (2003). Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. *Journal of Andrology*, *24*(4), 621–628.
- Biçer, Ş., Gürsul, C., Sayar, İ., Akman, O., Çakarlı, S., & Aydın, M. (2018). Role of ozone therapy in preventing testicular damage in an experimental cryptorchid rat model. *Medical Science Monitor*, *24*, 5832–5839. <https://doi.org/10.12659/MSM.910459>
- Bocci, V. A. (2006). Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Rivista Italiana Di Ossigeno-Ozonoterapia*, *5*(2), 93–104. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.08.006>
- Bocci, V., Borrelli, E., Travagli, V., I. Z. (2009). The Ozone Paradox: Ozone Is a Strong Oxidant as Well as a Medical Drug. *Medicinal Research Reviews*, *29*(4), 520–547. <https://doi.org/10.1002/med>
- Burnaugh, L., Ball, B. A., Sabeur, K., Thomas, A. D., & Meyers, S. A. (2010). Osmotic stress stimulates generation of superoxide anion by spermatozoa in horses. *Animal Reproduction Science*, *117*(3–4), 249–260. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.05.014>
- Büyükleblebici, S., Tuncer, P. B., Bucak, M. N., Eken, A., Sariözkan, S., Taşdemir, U., & Endirlik, B. Ü. (2014). Cryopreservation of bull sperm: Effects of extender supplemented with different cryoprotectants and antioxidants on sperm motility, antioxidant capacity and fertility results. *Animal Reproduction Science*, *150*(3–4), 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.09.006>
- Camargo, L. (2017). Correlação das proteínas do plasma seminal com a congelabilidade do sêmen de cães. Retrieved from <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/149830>
- Carneiro, J. A. M., Canisso, I. F., Bandeira, R. S., Scheeren, V. F. C., Freitas-Dell'Aqua, C. P., Alvarenga, M. A., ... Dell'Aqua, J. A. (2018). Effects of coenzyme Q10 on semen cryopreservation of stallions classified as having good or bad semen freezing ability. *Animal Reproduction Science*, *192*, 107–118. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.02.020>
- Casao, A., Mendoza, N., Pérez-Pé, R., Grasa, P., Abecia, J. A., Forcada, F., ... Muino-Blanco, T. (2010). Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility rate. *Journal of Pineal Research*, *48*(1), 39–46. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2009.00722.x>

- Darr, C. R., Cortopassi, G. A., Datta, S., Varner, D. D., & Meyers, S. A. (2016). Mitochondrial oxygen consumption is a unique indicator of stallion spermatozoal health and varies with cryopreservation media. *Theriogenology*, *86*(5), 1382–1392. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.082>
- Dodaran, H. V., Zhandi, M., Sharafi, M., Nejati-Amiri, E., Nejati-Javaremi, A., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., ... Shakeri, M. (2015). Effect of ethanol induced mild stress on post-thawed bull sperm quality. *Cryobiology*, *71*(1), 12–17. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.06.008>
- Freitas-Dell'Aqua, C.P., Guasti, P.N., Monteiro, G.A., Maziero, R.R.D., Dell'Aqua Jr, J.A., Papa, F.O. (2012). Flow cytometric analysis of fertile and subfertile frozen stallion spermatozoa. *Animal Reproduction*, *9*, 941.
- Gharagozloo, P., Gutierrez-Adan, A., Champroux, A., Noblanc, A., Kocer, A., Calle, A., ... Aitken, R. J. (2016). A novel antioxidant formulation designed to treat male infertility associated with oxidative stress: promising preclinical evidence from animal models. *Human Reproduction (Oxford, England)*, *31*(2), 252–262. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev302>
- Gibb, Z., & Aitken, R. J. (2016). Recent Developments in Stallion Semen Preservation. *Journal of Equine Veterinary Science*, *43*(June), S29–S36. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.06.006>
- Gibb, Z., Lambourne, S. R., & Aitken, R. J. (2014). The Paradoxical Relationship Between Stallion Fertility and Oxidative Stress. *Biology of Reproduction*. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.118539>
- Guasti P.N, Freitas-Dell'aqua C.P, Maziero R.R.D, Hartwig F.P, Monteiro G.A, Lisboa F.P, Papa F.O. (2012). Validation of flow cytometry for assessment of membrane lipid peroxidation of equine spermatozoa. *Animal Reproduction*, *9*, 929
- Hartwig, F. P., Lisboa, F. P., Hartwig, F. P., Monteiro, G. a., Maziero, R. R. D., Freitas-Dell'Aqua, C. P., ... Dell'Aqua, J. a. (2014). Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: An alternative for bad cooler stallions. *Theriogenology*, *81*(2), 340–346. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.10.003>
- Hezavehei, M., Kouchesfahani, H. M., Shahverdi, A., Sharafi, M., Salekdeh, G. H., & Eftekhari-Yazdi, P. (2019). Preconditioning of sperm with sublethal nitrosative stress: a novel approach to improve frozen–thawed sperm function. *Reproductive BioMedicine Online*, *38*(3), 413–425. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.11.029>
- Izadpanah, G., Zare-Shahneh, A., Zhandi, M., Yousefian, I., & Emamverdi, M. (2015). Melatonin Has a Beneficial Effect on Stallion Sperm Quality in Cool Condition. *Journal of Equine Veterinary Science*, *35*(7), 555–559. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2015.02.007>
- Kothari, S., Thompson, A., Agarwal, A., & du Plessis, S. S. (2010). Free

- radicals: Their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian Journal of Experimental Biology*, 48(5), 425–435.
- Lançonni, R., Celeghini, E. C. C., Alves, M. B. R., Lemes, K. M., Gonella-Diaza, A. M., Oliveira, L. Z., & Arruda, R. P. de. (2018). Melatonin Added to Cryopreservation Extenders Improves the Mitochondrial Membrane Potential of Postthawed Equine Sperm. *Journal of Equine Veterinary Science*, 69(June), 78–83. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2018.06.006>
- Leahy, T., & Gadella, B. M. (2011). Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage. *Reproduction*, 142(6), 759–778. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0310>
- Masoudi, R., Sharafi, M., Zare Shahneh, A., Kohram, H., Nejati-Amiri, E., Karimi, H., ... Shahverdi, A. (2018). Supplementation of extender with coenzyme Q10 improves the function and fertility potential of rooster spermatozoa after cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, 198(June), 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.09.019>
- Moraes, E. A., Matos, W. C. G., Graham, J. K., & Jr, W. D. F. (2015). Cholesterol-loaded-cyclodextrin improves the quality of stallion spermatozoa after cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, 158, 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.04.004>
- Nogueira, B. G., Sampaio, B. F. B., Souza, M. I. L., Costa e Silva, E. V., & Zúccari, C. E. S. N. (2015). Coenzyme Q10 and  $\alpha$ -Tocopherol Prevent the Lipid Peroxidation of Cooled Equine Semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(6), 1003–1010. <https://doi.org/10.1111/rda.12627>
- Peña, F. J., Rodríguez Martínez, H., Tapia, J. A., Ortega Ferrusola, C., González Fernández, L., & Macías García, B. (2009). Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: A review. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(2), 345–349. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01211.x>
- Peña, F., Plaza Davila, M., Ball, B., Squires, E., Martin Muñoz, P., Ortega Ferrusola, C., & Balao da Silva, C. (2015). The Impact of Reproductive Technologies on Stallion Mitochondrial Function. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(4), 529–537. <https://doi.org/10.1111/rda.12551>
- Pribenszky, C., Horváth, A., Végh, L., Huang, S. Y., Kuo, Y. H., & Szenci, O. (2011). Stress preconditioning of boar spermatozoa: A new approach to enhance semen quality. *Reproduction in Domestic Animals*, 46(SUPPL. 2), 26–30. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01812.x>
- Pribenszky, C., & Vajta, G. (2011). Cells under pressure: How sublethal hydrostatic pressure stress treatment increases gametes' and embryos' performance? *Reproduction, Fertility and Development*, 23(1), 48–55. <https://doi.org/10.1071/RD10231>
- Pribenszky, C., Vajta, G., Molnar, M., Du, Y., Lin, L., Bolund, L., & Yovich, J.

- (2010). Stress for stress tolerance? A fundamentally new approach in mammalian embryology. *Biology of Reproduction*, 83(5), 690–697. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.083386>
- Ramires Neto, C., Monteiro, G. A., Sancler-Silva, Y. F. R., Papa, P., Guasti, P. N., Resende, H. L., ... Alvarenga, M. a. (2014). Comparison of different freezing extenders for semen cryopreservation from stallions with poor and good semen freezability. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34(1), 58–60. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2013.10.035>
- Ramires Neto, C., Monteiro, G. A., Soares, R. F., Pedrazzi, C., Dell'aqua, J. A., Papa, F. O., & Alvarenga, M. A. (2013). Effect of Removing Seminal Plasma Using a Sperm Filter on the Viability of Refrigerated Stallion Semen. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33(1), 40–43. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2012.04.008>
- Safarinejad, M. R., Safarinejad, S., Shafiei, N., & Safarinejad, S. (2012). Effects of the reduced form of coenzyme Q 10 (ubiquinol) on semen parameters in men with idiopathic infertility: A double-blind, placebo controlled, randomized study. *Journal of Urology*, 188(2), 526–531. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2012.03.131>
- Sampaio, B. F. B., Nogueira, B. G., Souza, M. I. L., Silva, E. V. C., & Zúccari, C. E. S. N. (2018). Effects of ascorbic acid 2-glucoside and alpha-tocopherol on the characteristics of equine spermatozoa stored at 5°C. *Animal Science Journal*, 89(10), 1415–1423. <https://doi.org/10.1111/asj.12944>
- Sampaio, I.B.M. (2007). Estatística aplicada à experimentação animal. 3.ed. Belo Horizonte Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária, Belo Horizonte, 264p.
- SAS. (2001). Statistical Analysis System. SAS/STAT software, Version 8.02.
- Sharafi, M., Zhandi, M., Shahverdi, A., ... (2015). *Beneficial Effects of Nitric Oxide Induced Mild Oxidative Stress on Post-Thawed Bull Semen Quality*. 9(2), 230–237.
- Sharafi, M., Zhandi, M., & Akbari Sharif, A. (2015). Supplementation of soybean lecithin-based semen extender by antioxidants: complementary flowcytometric study on post-thawed ram spermatozoa. *Cell and Tissue Banking*, 16(2). <https://doi.org/10.1007/s10561-014-9458-5>
- Sieme, H., Oldenhof, H., & Wolkers, W. F. (2015). Sperm Membrane Behaviour during Cooling and Cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*, 50, 20–26. <https://doi.org/10.1111/rda.12594>
- Talevi, R., Barbato, V., Fiorentino, I., Braun, S., Longobardi, S., & Gualtieri, R. (2013). Protective effects of in vitro treatment with zinc, d-aspartate and coenzyme q10 on human sperm motility, lipid peroxidation and DNA fragmentation. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, 11(1), 81. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-11-81>

Zanardi, I., Borrelli, E., Valacchi, G., Travagli, V., & Bocci, V. (2016). Ozone: A Multifaceted Molecule with Unexpected Therapeutic Activity. *Current Medicinal Chemistry*, 23(4), 304–314.  
<https://doi.org/10.2174/0929867323666151221150420>

O artigo foi redigido conforme normas de publicação do periódico *Reproduction in Domestic Animals* e, portanto, de acordo com American Psychological Association, Sixth Edition; disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/14390531/homepage/forauthors.html>  
e <https://apastyle.apa.org/manual/>

## ANEXOS

Projeto Aprovado

Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



RESOLUÇÃO Nº 54 DE 15 DE AGOSTO DE 2017.

**A PRESIDENTE DO COLEGIADO DE CURSO DOS CURSOS DE MESTRADO E DOUTORADO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS** da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, no uso de suas atribuições legais, resolve, **ad referendum**:

Aprovar a substituição do projeto de tese do doutorando Bruno Gomes Nogueira, RGA 20157065, constante na Resolução nº 62, de 31 de julho de 2015, publicada no BS nº 6094, em 03-08-2015, Pg. 24, conforme se segue:

**Onde se lê:** RESPOSTAS DO SÊMEN OVINO AO USO DE SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES

**Leia-se:** RESPOSTA DO SÊMEN EQUINO CRIOPRESERVADO COM O USO DE SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES

ELIANE VIANNA DA COSTA E SILVA.

**Autorizações Legais**

Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**



## C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada “Respostas do sêmen equino criopreservado com o uso de substâncias antioxidantes”, registrada com o nº 913/2017, sob a responsabilidade de **Maria Inês Lenz Souza** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, na 10ª reunião ordinária do dia 09/11/2017.

FINALIDADE	( ) Ensino ( x ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	10/03/2015 a 10/03/2019
Espécie/Linhagem/Raça	<i>Equus caballus</i> / Quarto de Milha
Nº de animais	Machos 5 / Fêmeas 1 = 6
Peso/Idade	550kg / 5 - 10 anos
Sexo	Macho / Fêmea
Origem	Fazenda Escola da FAMEZ/UFMS

Joice Stein

Coordenadora da CEUA/UFMS  
Campo Grande, 09 de novembro de 2017.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA  
<http://www.propp.ufms.br/ceua>  
[ceua.propp@ufms.br](mailto:ceua.propp@ufms.br)  
fone (67) 3345-7925

### **Normas da Revista**

O artigo foi redigido conforme normas de publicação do periódico *Reproduction in Domestic Animals* e, portanto, de acordo com American Psychological Association, Sixth Edition; disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/14390531/homepage/forauthors.html> e <https://apastyle.apa.org/manual/>