



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



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

EFEITO DO OZÔNIO NA REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN
EQUINO

RAIZA ROCHA PEREIRA

CAMPO GRANDE, MS
2019



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



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

**EFEITO DO OZÔNIO NA REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN
EQUINO**

OZONE EFFECT ON EQUINE SEMEN COOLING

RAIZA ROCHA PEREIRA

**Orientador: Prof. Dr. Breno Fernandes Barreto Sampaio
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliane Vianna da Costa e Silva**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Produção animal.

**CAMPO GRANDE, MS
2019**



Ata de Defesa de Dissertação
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Mestrado

Aos sete dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e vinte, às treze horas e trinta minutos, na Sala de Reuniões da FAMEZ, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Breno Fernandes Barreto Sampaio (UFMS), Gustavo Guerino Macedo (UFMS) e Maria Ines Lenz Souza (UFMS), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho da aluna: **RAIZA ROCHA PEREIRA**, CPF 05116844102, Área de concentração em Produção Animal, do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Curso de Mestrado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "**Efeito do ozônio na refrigeração do sêmen equino**" e orientação de Breno Fernandes Barreto Sampaio. O presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra à aluna que expôs sua Dissertação. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, o presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR

Dr. Breno Fernandes Barreto Sampaio (Interno)

Dr. Gustavo Guerino Macedo (Externo)

Dra. Maria Ines Lenz Souza (Interno)

ASSINATURA	AVALIAÇÃO
	Aprovado
	Aprovado
	Aprovado

RESULTADO FINAL:

Aprovação

Aprovação com revisão

Reprovação

OBSERVAÇÕES:

~~_____~~
~~_____~~
~~_____~~
~~_____~~

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

Assinaturas:

Presidente da Banca Examinadora

Aluna

Certificado de aprovação

Raiza Rocha Pereira

Efeito do ozônio na refrigeração do sêmen equino

Ozone effect on equine semen cooling

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Mato Grosso
do Sul, como requisito à obtenção do
título de Mestra em Ciência Animal.

Aprovado(a) em: 07-02-2020

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Breno Fernandes Barreto Sampaio
Orientador (UFMS)

Dr. Gustavo Guerino Macedo
(UFMS)

Dra. Maria Inês Lenz Souza
(UFMS)



Resumo

PEREIRA, R.R. EFEITO DO OZÔNIO NA REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN EQUINO. 2019. Dissertação- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2019.

As espécies reativas de oxigênio (ROS) são fundamentais para fisiologia da célula espermática, participando de eventos importantes à fertilização, como reação do acrossoma, capacitação e hiperativação espermáticas. Porém, quando há um desequilíbrio entre a produção das ROS e a capacidade antioxidante, um processo de estresse oxidativo é estabelecido. Os espermatozoides equinos são mais susceptíveis ao estresse oxidativo, porque apresentam quantidades elevadas de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS) nas membranas. Essas insaturações são mais facilmente oxidadas e vulneráveis à peroxidação lipídica. O ozônio, quando usado em pequenas doses, causa um pré-condicionamento à oxidação, estimulando uma forte resposta antioxidante. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da ozonioterapia na qualidade espermática do sêmen equino refrigerado. Após a colheita, os ejaculados foram divididos em cinco grupos, controle (sem adição de ozônio) e outros quatro tratamentos nos quais adicionou-se ao meio de refrigeração diferentes concentrações de ozônio: $5 \mu\text{g}/\text{m}^3$, $15 \mu\text{g}/\text{m}^3$, $30 \mu\text{g}/\text{m}^3$ e $60 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ($\text{O}_3\text{-5}$, $\text{O}_3\text{-15}$, $\text{O}_3\text{-30}$, $\text{O}_3\text{-60}$, respectivamente). As análises espermáticas das amostras de sêmen ocorreram nos momentos 24 h (M24) e 48 h (M48) de refrigeração a 5°C e após estresse térmico de 37°C por 30 minutos (M24-30 e M48-30, respectivamente após 24 h e após 48 h de refrigeração). A cinética espermática realizou-se pela análise computadorizada do sêmen e as avaliações de lesões de membranas e peroxidação lipídica por citometria de fluxo. De acordo com os resultados, a adição de ozônio na concentração de $15 \mu\text{g}/\text{m}^3$, após 24 h de refrigeração demonstrou aumento nos parâmetros de motilidade total e progressiva do sêmen equino refrigerado, comparada ao controle e aos grupos $30 \mu\text{g}/\text{m}^3$ e $60 \mu\text{g}/\text{m}^3$; já a concentração de $5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ apresentou melhora significativa em relação ao controle, $30 \mu\text{g}/\text{m}^3$ e $60 \mu\text{g}/\text{m}^3$, na integridade de membrana plasmática e acrossomal. Na avaliação de 48 h de refrigeração, a adição de $5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ e $15 \mu\text{g}/\text{m}^3$ apresenta maiores resultados de porcentagem de espermatozoides rápidos e integridade de membrana em relação aos demais grupos nos dois momentos avaliados. Notou-se, também, queda da cinética e integridade de membrana nas maiores concentrações ($30 \mu\text{g}/\text{m}^3$ e $60 \mu\text{g}/\text{m}^3$). Portanto o efeito pró-oxidante do ozônio, quando em baixas concentrações de ozônio (5 e $15 \mu\text{g}/\text{m}^3$) conferiu proteção ao espermatozoide equino refrigerado, melhorando os parâmetros cinéticos de motilidade total e progressiva, e aumentando a integridade de membrana plasmática e acrossomal. Já as



concentrações mais altas (30 e 60 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) demonstraram ser deletérias ao espermatozoide equino refrigerado.

Palavras-chave: Espermatozoide; Garanhão; oxidante.



Abstract

PEREIRA, R.R. OZONE EFFECT ON EQUINE SEMEN COOLING. Ano. 2019. Dissertação- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2019.

Reactive oxygen species (ROS) are fundamental for sperm cell physiology, participating in important fertilization events, as well as acrosome reaction, capacitation and hyperactivation. However, when there is an imbalance between ROS production and antioxidant capacity, an oxidative stress process is established. Equine sperm are more susceptible to oxidative stress because they have high amounts of polyunsaturated fatty acids (PUFAS) in the membranes. These unsaturations are more easily oxidized and vulnerable to lipid peroxidation. Ozone when used in small doses causes a preconditioning of oxidation, thus stimulating a strong antioxidant response. The objective of this work was to evaluate the pro-oxidant effect of ozone on equine sperm cells submitted to refrigeration. Five stallions were used, four of which were ejaculated from each. After the collect, the ejaculates were divided into five groups, control (without addition of ozone) and four other groups in which different concentrations of ozone were added to the cooling medium: 5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 30 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ and 60 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (O₃-5, O₃-15, O₃-30, O₃-60 respectively). The sperm analysis of the semen samples took place at 24 h (M24) and 48 h (M48) cooling at 5°C and after thermal stress of 37°C for 30 minutes (M24-30 and M48-30, respectively after 24 h and after 48 h of cooling). Sperm kinetics were performed by computerized semen analysis and the evaluation of membrane lesions and lipid peroxidation by flow cytometry. According to the results, the addition of ozone at a concentration of 15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, after 24 h of refrigeration demonstrated an increase in the parameters of total and progressive motility of refrigerated equine semen compared to the control and to the groups 30 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ and 60 $\mu\text{g}/\text{m}^3$; the concentration of 5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ showed significant improvement in relation to the control, 30 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ and 60 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, in the integrity of the plasma and acrosomal membrane. In the evaluation of 48 h of refrigeration, the addition of 5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ and 15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ presented higher results of percentage of fast sperm and membrane integrity in relation to the others in the two evaluated moments. There is also a drop in membrane kinetics and integrity at the highest concentrations (30 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ and 60 $\mu\text{g}/\text{m}^3$). Therefore, the pro-oxidant effect of ozone in low concentrations of ozone (5



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



and 15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) provided protection to refrigerated equine sperm by improving the kinetic parameters of total and progressive motility, and increasing the integrity of the plasma and acrosomal membrane. The highest concentrations, 30 and 60 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, were shown to be lethal to refrigerated equine sperm.

Keywords: Sperm, Stallion, oxidant.



Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, que esteve sempre ao meu lado respondendo as minhas orações, me resguardando e me dando forças para continuar.

Aos meus pais Cladir Alzeman Rocha e Jair Oliveira Pereira, por nunca medirem esforços e não deixarem faltar nada, mesmos nos momentos de maior dificuldade, por sempre acreditarem nas minhas escolhas e me apoiarem incondicionalmente. Nos dias mais difíceis sempre com as palavras certas nas horas certas, e obrigada por nunca duvidarem do meu potencial, mesmo nos dias em que eu não acreditava que seria possível. Sou muito grata pelo exemplo de caráter, honestidade e perseverança, obrigada por me fazerem a pessoa que sou hoje.

Aos meus avós Clemente Rocha e Maria Dilma Alzeman Rocha, pelo exemplo de vida, de honestidade. Por toda ajuda em todos os momentos, por todos os colos, por secarem cada lágrima que eu derramei (e não foram poucas). Por sempre estarem ao meu lado, apoiando de forma incondicional, meus maiores incentivadores, as pessoas mais incríveis que eu já conheci.

À minha tia Cleide Alzeman Rocha, por tudo o que já fez e faz por mim, afinal somos um time. A mulher que eu sempre me espelhei, forte, corajosa, lutadora, perseverante, enfim faltam elogios para a senhora, obrigada por sempre estar comigo em os momentos, e obrigada até pelas broncas (também não foram poucas). Agradeço ao meu irmão Otavio Rocha Pereira por todo o apoio, toda conversa motivacional, por sempre estar ao meu lado.

Ao meu orientador e amigo Breno Fernandes Barreto Sampaio, pela confiança, paciência, determinação, e ensinamentos e orientação, sem você não teria conseguido.

Às minhas professoras co-orientadoras Eliane Costa e Silva e Camila de Paula Freitas dell'aqua, por sempre me ajudarem, pela paciência, ensinamentos, pelas correções, enfim muito obrigada por tudo.



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



A toda equipe do laboratório multiuso de reprodução animal (UFMS), especialmente a minha amiga e técnica do laboratório Bianca Acácio, pela ajuda no experimento, pelas conversas, pelas correções, por me salvar no inglês, pelo café, enfim pela sua amizade. Agradeço também ao Bruno Millan pela ajuda nas coletas e também no experimento.

Agradeço a todos os professores do Departamento de Reprodução animal (UFMS), dos programas de ensino Ciência Animal e Ciências Veterinárias pelos ensinamentos. Aos técnicos pela ajuda prestada.

A minha amiga irmã Fernanda Battistotti, que sempre esteve ao meu lado, nas aulas nos estudos, nas viagens a trabalho enfim todos os momentos, obrigada por tudo. E as minhas amigas que sempre estiveram ao meu lado ao longo desses anos (Carolina Coelho, Jadilla Coelho, Carolina Guizelini, Mariana Green, Renata Jacques, Mariny Sodré).

A todos os meus familiares, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando.

À Universidade Federal do Mato Grosso do Sul por todo o apoio prestado.

À CAPES, pelo suporte financeiro no mestrado.

A todos os citados, e a todos os amigos e colaboradores os quais não foram citados, mas fizeram e fazem parte da minha vida e do meu cotidiano. Sou eternamente grata.



Lista de ilustrações

Figura 1 - Regulação redox da capacitação espermática	14
Figura 2 - Compartimentalização da OXPHOS e da glicólise no espermatozoide.....	18
Figura 3 - Implicações da fosforilação oxidativa (OXPHOS).....	23



Lista de tabelas

Tabela1- Parâmetros da qualidade do sêmen equino pré-refrigeração (n=20) e variabilidade dos parâmetros da qualidade do sêmen (CV%), obtidos com Sperm Class Analyser (SCA) e Citometria de fluxo.....	42
Tabela 2 - Parâmetros espermáticos (MEAN \pm SEM) do sêmen equino refrigerado dos grupos controle e diferentes concentrações de O ₃ ozônio O ₃ -5, O ₃ -15, O ₃ -30, O ₃ -60 avaliados após 24 h de refrigeração (M 24).....	43
Tabela 3 - Parâmetros espermáticos (MEAN \pm SEM) do sêmen equino refrigerado dos grupos controle e as e as diferentes concentrações de O ₃ Ozônio O ₃ -5, O ₃ -15, O ₃ -30, O ₃ -60, após 24 h de refrigeração e submetidos a estresse térmico pela incubação por 30 minutos a 37°C (M 24-30).....	44
Tabela 4 - Parâmetros espermáticos (MEAN \pm SEM) do sêmen equino refrigerado dos grupos controle em diferentes concentrações de O ₃ Ozônio O ₃ -5, O ₃ -15, O ₃ -30, O ₃ -60 avaliados após 48h de refrigeração (M 48).....	45
Tabela 5. Parâmetros espermáticos (MEAN \pm SEM) do sêmen equino refrigerado dos grupos controle em diferentes concentrações de O ₃ Ozônio O ₃ -5, O ₃ -15, O ₃ -30, O ₃ -60 avaliados após 48h de refrigeração (M48) e submetidos a estresse térmico pela incubação por 30 minutos a 37°C.....	46



SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA	10
1. INTRODUÇÃO	10
2. ESPERMATOZOIDE	11
3. CAPACITAÇÃO E REAÇÃO DO ACROSSOMA	12
4. REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN EQUINO.....	15
5.METABOLISMO ENERGÉTICO.....	16
6.ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO.....	19
7.ESTRESSE OXIDATIVO E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	20
8. SISTEMA ANTIOXIDANTE.....	23
9. PRÓ-OXIDANTES E ESTRESSE SUBLETAL.....	24
10. OZÔNIO.....	25
10.1 MECANISMO DE AÇÃO DO OZÔNIO.....	26
11. REFERÊNCIAS	28
CAPÍTULO 2 – ARTIGO	
EFEITO DO OZÔNIO NA REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN EQUINO	35
REFERÊNCIAS	49

CAPÍTULO 1- REVISÃO DE LITERATURA

1.INTRODUÇÃO

O tipo de seleção realizada em equinos para a reprodução é baseado principalmente pelo desempenho físico ou desportivo, deixando o potencial reprodutivo em segundo plano, comprometendo a qualidade do ejaculado (Battut et al., 2016). Esse fato resulta na heterogeneidade dos reprodutores equinos que, por sua vez, pode levar ao uso de garanthões que não apresentam bons resultados na refrigeração do sêmen (Martins et al., 2016).

O sêmen equino refrigerado é uma biotécnica de grande importância para a reprodução assistida na equideocultura (Martins et al., 2016). Porém, quando o sêmen é refrigerado de forma inapropriada, pode levar ao choque térmico, fazendo com que ocorram danos irreversíveis para o espermatozoide. Há alterações nos parâmetros essenciais para fertilidade, como movimentos anormais (circular ou retrógrado), perda da motilidade, lesões no acrossoma, lesões na membrana plasmática, diminuição da atividade metabólica e perda dos componentes intracelulares. A exposição às baixas temperatura ocasiona a reorganização dos fosfolipídios da membrana plasmática (MP), levando ao aumento da produção das espécies reativas de oxigênio (ROS) e à peroxidação lipídica (Squires et al., 1999).

Assim, diversos estudos vêm acrescentando antioxidantes aos meios diluidores na tentativa de atenuar ou, até mesmo, neutralizar os efeitos nocivos das ROS (Ghallab et al., 2017). As terapias com ozônio vêm sendo testadas em diferentes estudos com ação antioxidante e resultados promissores para redução do estresse oxidativo (Di Fillipo et al., 2008; Bocci et al., 2011; Ínal et al., 2011; Ho et al., 2013; Haj et al., 2014; Onal et al., 2015; Sayar et al., 2016).

A ozonioterapia é realizada com uma mistura de gases: 5% de O₃ (ozônio) e 95% de O₂ (oxigênio). O ozônio é um gás instável, formado pela combinação de três átomos de oxigênio em uma estrutura cíclica. O ozônio é o terceiro oxidante mais potente após flúor e persulfato (Bocci, 2006). De acordo com Bocci et al (2011), o ozônio, quando utilizado em concentrações adequadas, produz alguns efeitos importantes, como a regulação positiva das enzimas antioxidantes, a modulação imunológica pela ativação da síntese de neutrófilos e citocinas e o aumento da

oxigenação tecidual. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da ozonioterapia na qualidade espermática do sêmen equino refrigerado.

2. ESPERMATOZOIDE EQUINO

Os espermatozoides são células altamente especializadas, desempenhando um papel fundamental para a fertilização e carregando o DNA paterno. Ocorre um intenso deslocamento do espermatozoide desde a sua deposição no útero até o local de fertilização na tuba uterina, esta célula deve ser capaz de se movimentar e passar pelo processo de capacitação espermática a fim de fertilizar o oócito (Flesch e Gadella, 2000).

O processo de espermatogênese requer remodelação extensiva de uma célula esférica convencional para se tornar uma célula morfológicamente distinta. Durante essa transformação, a cromatina no interior do núcleo do espermatozoide é altamente condensada, com volume cerca de 10% menor do que o de uma célula somática (Flesch e Gadella, 2000). Para adquirir esse nível de compactação, as histonas são substituídas por protaminas e o complexo DNA-protamina é enrolado numa forma helicoidal. Esse modelo fornece proteção adicional contra os efeitos de fatores genotóxicos (fragmentação de DNA) e confere conformação ideal à célula para executar sua função, facilitando a motilidade e penetração na zona pelúcida (Braun, 2001; Miller et al., 2010).

O acrossoma espermático recobre dois terços do núcleo em sua porção apical, estrutura vesicular derivada do complexo de Golgi, rica em enzimas hidrolíticas, proteases e receptores para executar a interação com o oócito, possibilitando a fertilização (Flesch e Gadella, 2000; Hermo et al., 2010).

A vulnerabilidade dos espermatozoides ao estresse oxidativo é, em grande parte, consequência de sua estrutura anatômica e composição bioquímica altamente especializadas. Além disso, ao contrário da maioria das células somáticas, que possuem um espaço citoplasmático abundante para abrigar suas enzimas antioxidantes, as células espermáticas possuem um citoplasma limitado, sendo sua porção mais abundante na peça intermediária (Aitken et al., 2014).

Os espermatozoides equinos apresentam quantidades elevadas de ácidos

graxos poli-insaturados (PUFAS) nas membranas. Em relação aos constituintes das membranas celulares, estas células contêm em média 14% de lipídios, sendo 59,0% de fosfolipídios, 13% de colesterol, 9,0% de diglicerídeos, 8,0% de triglicerídeos e 11,0% de ésteres. Dentre os lipídios neutros, o colesterol é o que apresenta o teor mais variável entre espécies e entre ejaculados de um mesmo indivíduo, variando de 13 a 37% do total de lipídeos. A função do colesterol é estabilizar os fosfolipídios, mantendo a membrana em um estado de fluidez compatível com a sobrevivência da célula e execução de sua tarefa. Os ácidos graxos insaturados em concentração mais elevada são ácido araquidônico (18%), ácido docosapentanóico (17%), ácido oleico (5%) e ácido docosahexanóico (8%). A proporção de ácidos graxos insaturados para ácidos graxos saturados nos fosfolipídios dos espermatozoides de garanhão é de 0,90 (Flesch e Gadella, 2000). Essa alta proporção de ácidos graxos insaturados é outro ponto de vulnerabilidade dos espermatozoides aos efeitos de ROS. PUFAS tornam os espermatozoides mais sensíveis ao estresse oxidativo, pois as ligações carbono-hidrogênio adjacentes às ligações duplas são mais instáveis e susceptíveis ao sequestro de hidrogênio pelas ROS (Aitken et al., 2014).

3. CAPACITAÇÃO E REAÇÃO DO ACROSSOMA

Os espermatozoides alcançam competência funcional pelo processo de maturação pós-testicular, durante o trânsito no epidídimo. Após a ejaculação, no trajeto pelo trato reprodutivo feminino, os espermatozoides passam por uma série complexa de transformações que envolvem alterações metabólicas, iônicas e estruturais que são chamadas, coletivamente, de capacitação (Jonge, 2005). Este processo fornece aos espermatozoides uma série de comportamentos essenciais para a consecução da fertilização, incluindo motilidade hiperativada, reconhecimento de espermatozoide - zona pelúcida e a exocitose das enzimas contidas no acrossoma (Gadella et al., 2001).

A hiperativação do movimento é necessária para o espermatozoide penetrar na zona pelúcida do oócito, e ocorre no local da fertilização, durante o processo de capacitação espermática (Ho e Suarez, 2001). Já a reação acrossômica é um evento

de excitose, iniciado após a ligação de uma célula espermática à glicoproteína 3 da zona pelúcida (ZP3) do oócito, no qual enzimas hidrolíticas e proteolíticas (principalmente acrosina e hialuronidase) são liberadas para poder penetrar a zona pelúcida e fundir-se ao oócito. A fusão entre a membrana acrossomal externa e a membrana plasmática na cabeça do espermatozoide ocorre de forma a liberar o conteúdo acrossômico (Florman et al., 2008).

O primeiro evento na capacitação é o efluxo de colesterol, que está associado com a ativação das vias de transdução de sinais (Flesch e Gadella, 2000). O efluxo é promovido mediante carreadores de esterol, como albumina e lipoproteínas de alta densidade presentes nos fluidos uterino e folicular. Esse aumento na fluidez da membrana pode incrementar a permeabilidade desta para vários íons, tais como cálcio e bicarbonato, que afetam as moléculas de sinalização (Naz e Rajesh, 2004).

A capacitação espermática é um processo regulado pela redução da oxidação (redox) (Figura1). Essa via de transdução de sinal é dirigida pelo monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), modulada pelo status redox das células (Aitken et al., 1998). A geração de ROS exerce uma influência positiva na fosforilação da tirosina, como demonstrado nos espermatozoides de seres humanos (Aitken et al., 1998), roedores (Lewis & Aitken, 2001), bovinos (O'Flaherty et al., 2005) e equinos (Baumber et al., 2002).

Os mecanismos pelos quais as ROS estimulam a capacitação espermática são numerosos e envolvem a estimulação da atividade da adenilciclase (Aitken et al., 1998), acompanhados pelo ativação da proteína quinase A (O'Flaherty et al., 2006), indução da oxidação do colesterol e consequente efluxo da membrana plasmática (Boerke et al., 2013), ativação de proteínas do tipo quinase (O'Flaherty et al., 2006) e a inibição da atividade da tirosina fosfatase (Aitken et al., 1998).

A ação das ROS no processo de capacitação dos espermatozoides de mamíferos é dependente do bicarbonato; quando este encontra-se em níveis aumentados, há um aumento da produção de ROS (Ecroyd et al., 2003) e oxidação de esteróis (Boerke et al., 2013). A regulação do bicarbonato, tanto na fosforilação da tirosina quanto na geração de radicais livres, provavelmente é pela produção de AMPC. O requisito para capacitação envolve a estimulação da geração de AMPC e a inibição da atividade da tirosina fosfatase (Boerke et al., 2013). No entanto, o

conhecimento atual das vias bioquímicas que ligam Bicarbonato- ROS – AMPc, e a ativação da proteína cinase A, fosforilação de proteínas e capacitação não é completamente esclarecido (Aitken, 2017).

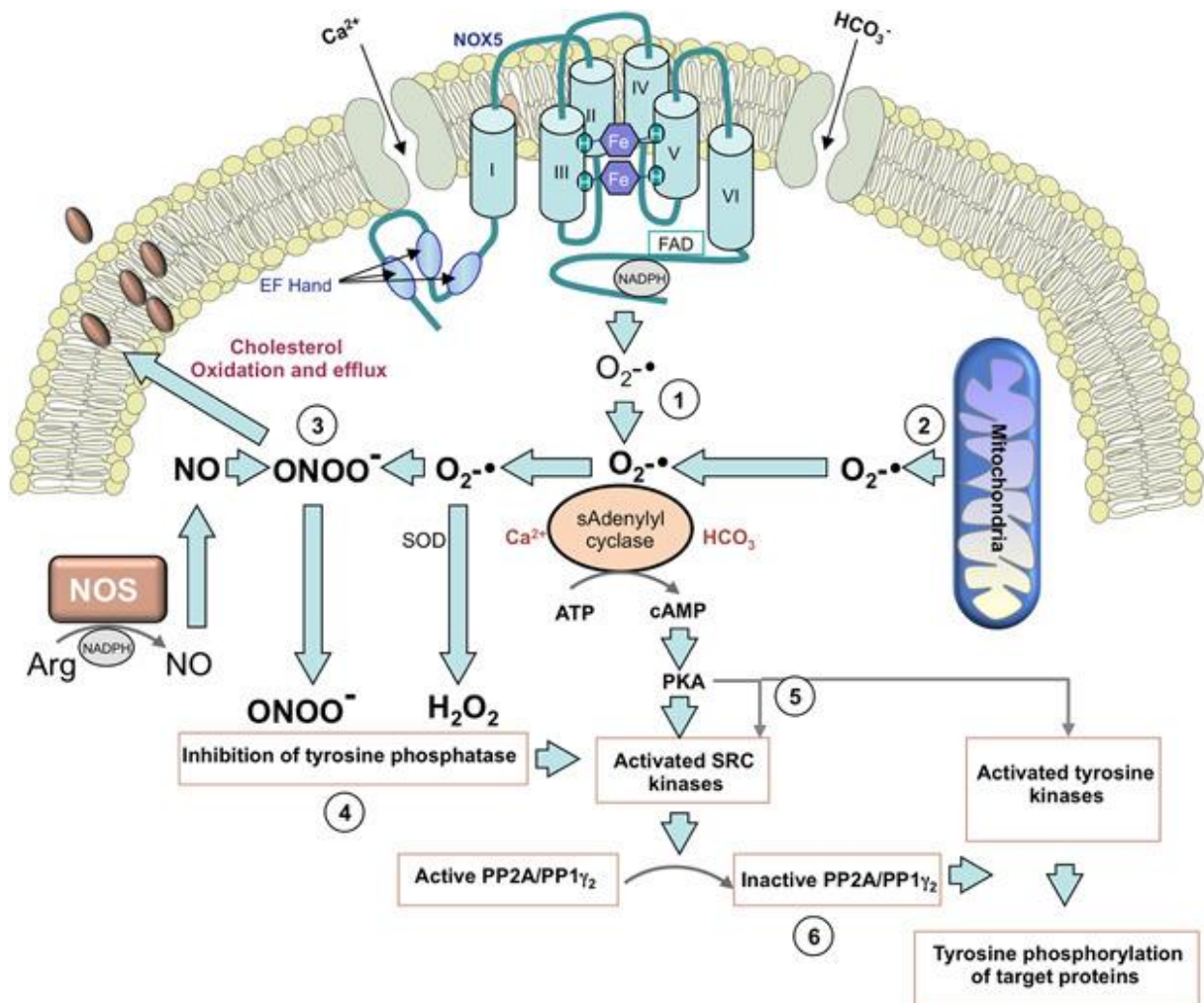


Figura 1. Regulação redox da capacitação espermática. NADPH oxidases são capazes de gerar $O_2^{\cdot-}$ (1). A segunda fonte de $O_2^{\cdot-}$ espermatozoides de mamíferos são as mitocôndrias, que produzem ROS durante a respiração em estado estacionário, mas têm o potencial de acelerar essa atividade quando esses gametas entram na via apoptótica intrínseca (2). O $O_2^{\cdot-}$ liga-se com NO produzido por sintase de óxido nítrico (NOS), resultando no peróxinitrito (ONOO \cdot), que medeia a oxidação do colesterol em oxisteróis. Esses oxisteróis saem da membrana plasmática, aumentando a fluidez da membrana (3). A ação combinada de ONOO \cdot e H_2O_2 (gerado como um resultado da atividade da SOD), concomitantemente, leva à inibição da atividade da tirosina fosfatase (4). A combinação de $O_2^{\cdot-}$, bicarbonato (HCO_3^-) e Ca^{2+} ativa adenilciclase, estimulando a produção de AMPc e a ativação da Proteína quinase A (PKA). Estes últimos ativam diretamente SRC (5). O SRC, então, fosforila e inativa a proteína fosfatase, permitindo a fosforilação da tirosina que caracteriza o estado capacitado (6). Fonte: Aitken (2017).

Um papel central para o H_2O_2 durante a capacitação é indicado pelo fato de que a sua adição direta em experimentos com sêmen de humanos, hamsters e bovinos aumenta a fosforilação da tirosina e os indicativos de capacitação (Bize et al., 1991; Aitken et al., 1998; O'Flaherty et al., 2006). Da mesma forma, a criação artificial de condições de oxidação pela exposição dos espermatozoides às ROS geradas extracelularmente, usando sistemas de glicose oxidase ou xantina oxidase, estimula a capacitação e a fosforilação da tirosina em várias espécies (humanos, hamsters, bovinos e equinos), e podem ser revertidos pela adição da enzima catalase (Bize et al., 1991; Aitken et al., 1995; Baumber et al., 2002; Rivlin et al., 2004). A importância biológica do H_2O_2 é enfatizada ainda mais pela capacidade da enzima catalase de inibir a indução espontânea da fosforilação da tirosina nos espermatozoides de mamíferos em capacitação e suprimir as funções espermáticas, como hiperativação, exocitose acrossomal e fusão de oócitos e espermatozoides que são, em última análise, dependentes da obtenção de um estado capacitado (Aitken et al., 1995).

4. REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN EQUINO

O sêmen resfriado é utilizado na rotina de muitos centros de coletas. Porém os efeitos negativos atribuídos ao estresse oxidativo no espermatozoide, que ocorre nos procedimentos em baixas temperaturas, limita o uso desta biotecnologia (Newcombe et al., 2011).

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. Nesta faixa de temperatura ocorre a transição de fase dos lipídeos da membrana plasmática (MP), que passam do estado líquido-cristalino para gel, e uma curva de refrigeração lenta neste período pode reduzir os danos causados à MP, relacionados ao estresse térmico. Esta fase crítica ocorre entre 19 e 8°C, momento em que a taxa de refrigeração deve ser de -0,05°C/min, favorecendo a reorganização dos lipídeos da membrana plasmática (Squires et al., 1999).

A função dos diluidores, tanto no processo de refrigeração como de congelação, é a diminuição dos efeitos do estresse osmótico e do estresse oxidativo,

estabilização dos componentes da membrana plasmática e prolongar sua viabilidade (Graham, 2011). Os diluidores mais comumente utilizados são a base de leite em pó desnatado, glicose e tampão bicarbonato. Alguns diluidores incorporam em seu meio gema de ovo, antibióticos, açúcares, aminoácidos (Loomis e Squires, 2001; Loomis, 2006) e substâncias antioxidantes (Ghallab et al., 2017).

5. METABOLISMO ENERGÉTICO

Como nas células somáticas, as vias metabólicas comumente utilizadas pelos espermatozoides para produzir ATP são a glicólise e a fosforilação oxidativa (OXPHOS). As enzimas necessárias para a glicólise estão, principalmente, associadas à bainha fibrosa localizada na parte principal da cauda. Por outro lado, OXPHOS ocorre nas cristas mitocondriais, sendo um método significativamente mais eficiente de produção de ATP do que a glicólise. Apesar disso, os espermatozoides de espécies como humanos e roedores dependem, predominantemente, da glicólise para a produção de ATP (Storey, 2008).

Apesar da presença bem caracterizada de proteínas transportadoras de glicose (GLUTs) no espermatozoide equino, tornou-se evidente que os espermatozoides de ganhão diferem das outras espécies, pois suas principais demandas de energia são atendidas não pelas vias glicolíticas, mas pela OXPHOS e, na presença de inibidores mitocondriais, eles sofrem um rápido declínio no conteúdo de ATP. Essa dependência resulta em uma relação inversamente proporcional entre a produção de ROS e a fertilidade no ganhão (Gibb et al., 2014).

Grandes moléculas polares, como a glicose, não podem se difundir através das membranas, e seu transporte é facilitado pelas proteínas transportadoras de glicose (GLUTs), as quais são classificadas de acordo com sua capacidade relativa de transportar hexoses (como glicose, manitol e frutose), amino-açúcares ou vitaminas. Desde a descoberta do transportador de glicose GLUT1, muitas GLUTs adicionais foram caracterizadas. Nos espermatozoides da maioria das espécies, a distribuição de GLUTs muda junto com o status de capacitação da célula (ou seja,

entre estados não capacitados e capacitados), para fornecer energia nos locais que requerem modificações na membrana ou hiperativação da motilidade. Por outro lado, a distribuição de GLUTs nos espermatozoides do garanhão não muda com o status de capacitação da célula, indicando que, em espécies que dependem prioritariamente de OXPHOS, a glicólise não é necessária para apoiar a produção de ATP para capacitação e reação do acrossoma (Bucci et al., 2010).

Os componentes da cadeia transportadora de elétrons estão localizados na membrana interna das mitocôndrias. A OXPHOS é a via comum pela qual os elétrons de diferentes combustíveis do organismo fluem para o oxigênio (Champe et al., 2006). A cadeia respiratória é organizada em cinco complexos supramoleculares, sendo que, ao final, o oxigênio (O_2) é reduzido, gerando água (H_2O). O complexo I catalisa a transferência de elétrons para a ubiquinona a partir de dois doadores de elétrons diferentes: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH, complexo I) e flavina-adenina dinucleotídeo ($FADH_2$), os quais são oriundos do ciclo de Krebs e da glicólise (Ferramosca e Zara, 2014). O complexo III carrega elétrons da ubiquinona reduzida para o citocromo c, e o complexo IV transfere elétrons do citocromo c para o O_2 . Neste processo, prótons (H^+) bombeados para o espaço entre as membranas geram um gradiente químico e elétrico que possibilita o fluxo inverso dos prótons pela ATP sintetase (complexo V), com a resultante formação de ATP (Nelson e Cox, 2014).

A produção mitocondrial de radicais superóxido ocorre, principalmente, em dois pontos da cadeia transportadora de elétrons, no complexo I (NADH: coenzima Q redutase) e no complexo III (ubiquinol: citocromo c redutase). No entanto, dentre os dois pontos, o complexo III é o principal local de produção de ROS. Elétrons dos complexos desidrogenases I ou II são transferidos à coenzima Q (ubiquinona). A forma reduzida resultante (QH_2), em seguida, sofre duas reduções sequenciais de um elétron (o ciclo Q) usando formas de citocromo b oxidada e reduzida e citocromo c. O intermediário instável no ciclo Q pode conduzir à formação de superóxido por transferência direta de elétrons para o oxigênio molecular. A geração de ânion superóxido é não enzimática e, portanto, quanto maior a taxa de metabolismo, maior será a produção de ROS (Finkel e Holbrook, 2000).

A alta produção de ROS pelo espermatozoide equino é um cenário fisiologicamente normal causado por vazamento de superóxido da cadeia de

transporte de elétrons mitocondriais durante a OXPHOS, levando ao aumento das taxas de peroxidação lipídica e, após armazenamento prolongado, perda da cinética espermática e danos morfofuncionais da estrutura espermática (Gibb et al, 2014). Esse fenômeno introduz uma série de implicações para o armazenamento dos espermatozoides de garanhões, uma vez que a geração prolongada de ROS na ausência de radicais extracelulares e sequestradores de aldeídos lipídicos leva a danos oxidativos irreversíveis, prejudicando a integridade do DNA e a funcionalidade dos espermatozoides (Aitken et al., 2014).

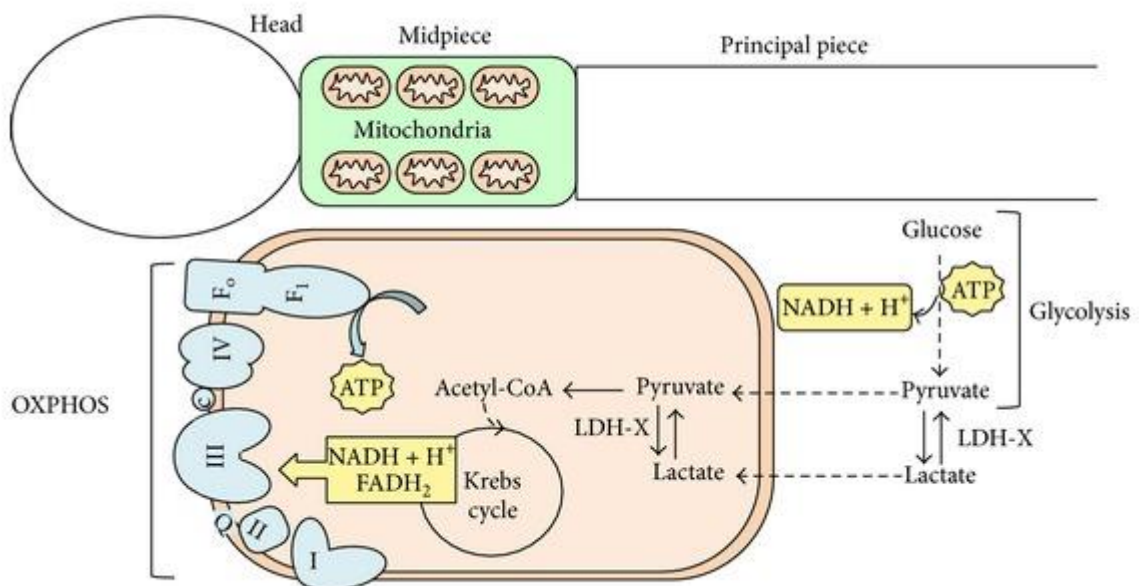


Figura 2. Compartimentalização da OXPHOS e da glicólise no espermatozoide. O sistema OXPHOS é composto por cinco complexos. O transporte de elétrons do Complexo I para o Complexo IV é acoplado à síntese de ATP. Os equivalentes redutores (NADH e FADH₂) produzidos pela glicólise e as reações do ciclo de Krebs são transferidos para a cadeia de transporte de elétrons ligada à membrana. c, citocromo c; Q, ubiquinona. Fonte: Ferramosca e Zara (2014).

6. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS)

As ROS são produzidas por meio de reações metabólicas normais e desempenham papéis em múltiplos processos, como apoptose e sinalização celular. Algumas das ROS se enquadram na categoria de radicais livres, definidos por átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada (Nordberg e Arnér, 2001). As ROS reagem com qualquer componente bioquímico da célula, particularmente lipídios nas membranas celulares. Os espermatozoides, como as células somáticas, possuem a capacidade de gerar e degradar ROS que, em equilíbrio com antioxidantes, são importantes para que a célula realize suas funções fisiológicas. Desempenham, também, um papel importante na função normal dos espermatozoides, incluindo a hiperativação da motilidade, a quimiotaxia, a capacitação e a reação acrossômica (Gibb et al., 2014).

A principal ROS produzida é o ânion superóxido (O_2^-), formado após o oxigênio ser reduzido na presença de um elétron livre (e^-). O ânion superóxido está presente, principalmente, em ambientes aeróbicos ricos em elétrons, na membrana mitocondrial e através da cadeia respiratória (Maia e Bicudo, 2009). Na presença de superóxido dismutase (SOD) ou pela desmutação espontânea forma-se o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Ball, 2011).

O H_2O_2 penetra facilmente em membranas biológicas, desempenhando um papel formador de radical como um intermediário na produção de moléculas de ROS mais reativas como o radical hidroxila (OH^\cdot), por meio de oxidação de metais de transição (Silva e Guerra, 2010).

O radical hidroxila (OH^\cdot) é o radical livre com maior capacidade de danos à célula espermática, formado a partir da reação de Fenton, em que o peróxido de hidrogênio sofre uma reação catalisada por íons metálicos (Fe^{2+} ou Cu^+): $H_2O_2 + Cu^+ / Fe^+ \rightarrow OH^\cdot + OH^- + Cu^{2+} / Fe^{3+}$ (Nordberg e Arnér, 2001). Este radical é considerado o mais deletério para a célula espermática, pois reage rapidamente com metais ou outros radicais no sítio onde foi produzido, promovendo danos ao DNA e oxidação de ácidos graxos de membranas celulares (Sikka, 2001).

7. ESTRESSE OXIDATIVO E PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre as ROS e as defesas antioxidantes das células. Este desequilíbrio na produção ou degradação das ROS pode ter efeitos adversos nos espermatozoides (Nordberg e Arnér, 2001). Durante o armazenamento por refrigeração ou criopreservação, o estresse oxidativo é ainda maior em situações em que grande parte do plasma seminal é removido de uma amostra de sêmen, onde está a maioria das enzimas antioxidantes (Ball, 2008; Loomis, 2006). No decorrer do procedimento de refrigeração, há um aumento na concentração de cálcio intracelular e uma geração aumentada de ROS. Há também uma elevação nos níveis de osmolaridade, estimulando um aumento dependente de ROS na fosforilação da tirosina, podendo levar à capacitação prematura dos espermatozoides (Nordberg e Arnér, 2001).

Sabe-se que o estresse oxidativo causa danos ao espermatozoide, as ROS são um dos fatores que influenciam a fertilidade equina (Morrell et al., 2014). É descrita na literatura uma correlação positiva entre a taxa de prenhez utilizando sêmen refrigerado e a proporção de espermatozoides com morfologia normal, bem como uma correlação negativa significativa entre a taxa de prenhez e células espermáticas com danos à cromatina. Este dano foi atribuído, principalmente, pelo estresse oxidativo ao qual o sêmen foi submetido durante o procedimento de refrigeração (Morrell et al., 2008).

Morrell et al. (2014), em experimento com sêmen refrigerado, encontraram alta variação nos níveis de ROS entre garanhões. Animais que apresentavam menor quantidade de H_2O_2 mostravam maior motilidade, menos lesão de membrana plasmática e menor dano na cromatina. Já aqueles que apresentavam maiores níveis de H_2O_2 foram relacionados negativamente com a taxa de fêmeas prênes. Esses resultados, para amostras de sêmen, indicam que existe uma alta variação individual das concentrações de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, e que o status de ROS pode influenciar a qualidade seminal.

Nas cristas mitocondriais ocorre o metabolismo oxidativo que resulta na doação de elétrons para a molécula de oxigênio, gerando ânion superóxido, que rapidamente se desloca para o H_2O_2 sob a ação da superóxido dismutase (SOD). Qualquer impedimento ao fluxo de elétrons ao longo da membrana mitocondrial interna,

desencadeará geração de ânion superóxido por essas organelas da célula espermática (Peña et al., 2009). Embora os espermatozoides defeituosos tenham, frequentemente, perdido seu potencial de membrana mitocondrial, a despolarização nessas organelas não desencadeia, por si só, uma explosão de geração de ROS mitocondriais. Contudo, a perda de potencial mitocondrial vista, em casos de função espermática defeituosa, pode ser uma consequência e não uma causa de estresse oxidativo dentro dessas células. A redução da motilidade espermática associada às ROS ocorre na ausência de qualquer diminuição detectável na integridade da membrana plasmática, integridade acrossomal ou potencial de membrana mitocondrial. Portanto, a motilidade dos espermatozoides é um indicador sensível do estresse oxidativo e pode ser um dos primeiros parâmetros afetados durante o estresse oxidativo (Peña et al., 2015).

O processo das reações em cadeia de peroxidação lipídica é facilitado pelas duplas ligações presentes nos ácidos graxos insaturados. Os espermatozoides são particularmente susceptíveis ao ataque oxidativo, porque sua membrana plasmática é rica em PUFAS, para fornecer a fluidez de membrana necessária para os eventos de fusão associados à fertilização, especialmente a reação do acrossoma e a fusão de espermatozoides-oócitos (Aitken et al., 2014). O impacto da peroxidação lipídica na função espermática é claramente refletido pela perda de motilidade. De fato, a relação entre peroxidação lipídica e motilidade é evidente quando ocorre um aumento na motilidade espermática dos espermatozoides depois de serem expostos aos antioxidantes como melatonina, carnitina e α -tocoferol (Ashrafi et al., 2013; Nogueira et al., 2015; Longobardi et al., 2017).

Proteínas do DNA funcionalmente importantes também estão sujeitas à modificação por aldeídos, como o 4-hidroxinonenal (4HNE), gerado em consequência do processo peroxidativo. As proteínas adicionadas pelo 4HNE incluem elementos da cadeia mitocondrial de transporte de elétrons, como a desidrogenase do ácido succínico (Aitken et al., 1995). O resultado desse ataque eletrolítico é estimular a produção de ROS nas mitocôndrias em um ciclo de peroxidação lipídica autoperpetuante que, em última instância, desencadeia a via apoptótica intrínseca, levando a uma rápida perda de motilidade e apoptose celular. Um dos principais pontos de diferença entre a apoptose em espermatozoides e células somáticas é que, na célula espermática, o DNA nuclear está localizado na cabeça, separado da

mitocôndria e da maior parte do citoplasma. Como resultado, as nucleases ativadas e liberadas na peça intermediária durante a apoptose não acessam o DNA na cabeça do espermatozoide para clivá-lo. No entanto, as ROS geradas durante a apoptose podem facilmente obter acesso ao núcleo do espermatozoide e gerar uma base oxidativa, tipicamente 8-hidroxi, 2'-desoxiguanosina (8OHdG), que são convertidos em locais básicos por 8-oxoguanina glicosilase (OGG1), a única enzima da via de reparo de excisão de base existente nos espermatozoides (Aitken et al., 2014).

Uma vez iniciado o estresse oxidativo (Figura 3), aldeídos como o 4-hidroxinonenal ou a acroleína, gerados como consequência da peroxidação lipídica, desencadeiam uma geração adicional de ROS pelas mitocôndrias do espermatozoide e aceleram o início de um processo apoptótico intrínseco, que inevitavelmente, leva à morte celular (Moazamian et al., 2015). A peroxidação lipídica de ácidos graxos insaturados na membrana plasmática do espermatozoide interrompe todas as funções dependentes da membrana nessas células, incluindo motilidade e fusão de espermatozoides-oócito. Além disso, o estresse oxidativo pode danificar a integridade do DNA no núcleo espermático e nas mitocôndrias. Esse dano pode ser aumentado por erros de espermiogênese, levando à remodelação da cromatina prejudicada durante os estágios finais da diferenciação espermática e à fraca protaminação da cromatina. A presença de dano ao DNA nos espermatozoides também está associada às falhas na fertilização e desenvolvimento embrionário anormal (Aitken e Curry, 2011).

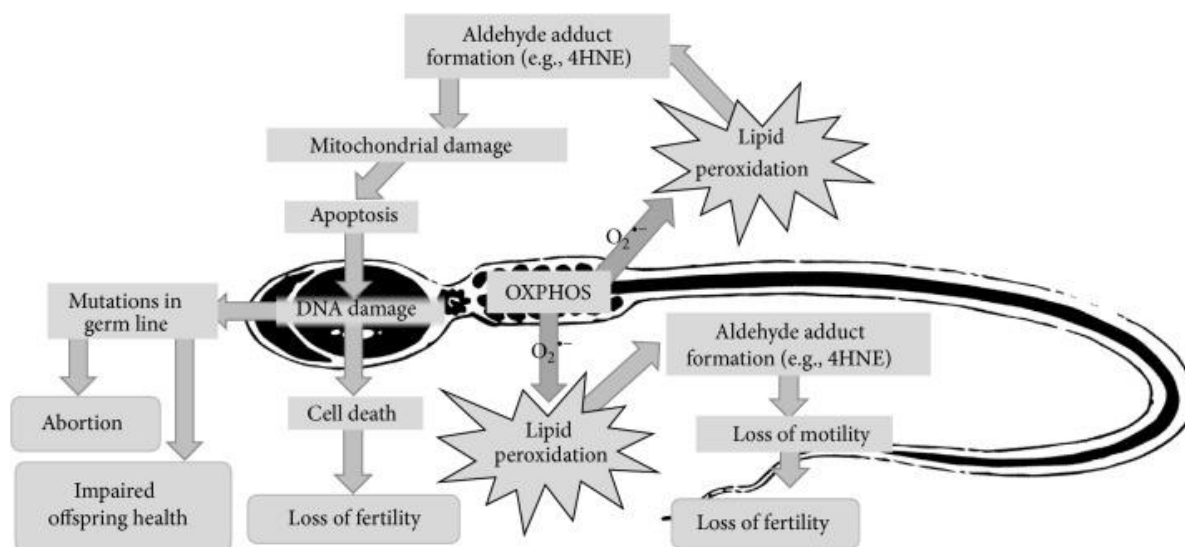


Figura 3. Implicações da fosforilação oxidativa (OXPHOS). O vazamento de superóxido mitocondrial ($O_2^{\cdot -}$) causa peroxidação lipídica e produção reativa de aldeído eletrofílico. Esses aldeídos se agregam às proteínas funcionais, resultando em perda de motilidade e danos mitocondriais, que podem desencadear apoptose e danos oxidativos no DNA. Fonte: (Gibb e Aitken, 2016).

8. SISTEMA ANTIOXIDANTE

O sistema responsável pela resposta à oxidação é constituído pelos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. A principal defesa, do sistema antioxidante enzimático, chamado também de agentes naturais do sêmen, é composta pelos sequestradores de ROS primários: a catalase (CAT), a (SOD) e a glutaciona peroxidase (GPx) (Ball, 2008). A SOD é considerada uma metaloenzima; seu papel antioxidante é exercido quando catalisa a dismutação de duas moléculas de $O_2^{\cdot -}$ em H_2O_2 e O_2 . A CAT é responsável por catalisar a dismutação de H_2O_2 , reduzindo-o a duas moléculas de H_2O e uma de O_2 . Sua ação antioxidante é de grande importância, pois diminui o risco de formação do radical OH^{\cdot} . Já a GPx, além de atuar na redução do H_2O_2 em H_2O e O_2 , também atua na redução de outros peróxidos a álcool, como o lipoperóxido nas membranas celulares (Nordberg e Arnér, 2001).

Os antioxidantes não enzimáticos, conhecidos como compostos de baixo peso molecular, incluem vitamina C, vitamina A, α -tocoferol (α -TOH), ácido α -lipoico, ácido úrico, zinco, taurina, hipotaurina, coenzima Q10 e melatonina, sendo encontrados no plasma seminal (Andrade et al., 2010). Estudos vêm acrescentando antioxidantes aos meios diluidores na tentativa de atenuar ou, até mesmo, neutralizar os efeitos nocivos das ROS (Sikka, 2010; Ghallab et al., 2017). Porém, esta abordagem é restrita pela biodisponibilidade escassa no citoplasma ou a incapacidade desses agentes de atingir os receptores apropriados para estimular a resposta antioxidante (Bocci e Valacchi., 2015).

9. PRÓ-OXIDANTES E ESTRESSE SUBLETAL

Pró-oxidantes são definidos como produtos químicos que induzem o estresse oxidativo, geralmente através da formação de espécies reativas de (O_2 e N_2) ou inibindo sistemas antioxidantes (Puglia e Powell, 1984; Carochi e Ferreira, 2013). Trabalhos vem sendo realizados com substâncias pró-oxidantes adicionadas ao sêmen, a fim de induzir um estresse subletal, estimulando a resposta do sistema antioxidante, melhorando a resistência de oócitos, embriões e espermatozoides (Pribenszky et al., 2011; Sharafi et al., 2015).

O uso de óxido nítrico na dose subletal (NO-0,01 μ M) antes da criopreservação dos espermatozoides humanos melhorou significativamente a motilidade total e progressiva pós descongelamento (Hezavehei et al., 2019). Sharafi et al. (2015) utilizaram, o óxido nítrico antes da criopreservação do sêmen bovino e tiveram como resultado, com a dose deletéria (NO- 1 μ M), aumentos significativos na motilidade total e progressiva, integridade de membrana plasmática e diminuição de células espermáticas apoptóticas. Dodaran et al. (2015) expôs espermatozoides bovinos ao estresse subletal utilizando etanol antes do procedimento de criopreservação, o que aumentou o potencial mitocondrial das células espermáticas pós descongelamento.

Rahman et al. (2012) induziram o estresse subletal oxidativo com a concentração de 200 μ M de H_2O_2 em espermatozoides bovinos antes da fertilização

in vitro, tendo como resultados o aumento da integridade de cromatina, das taxas de fertilização e de clivagem. Os espermatozoides de suínos foram submetidos a tensões subletais com alta pressão hidrostática (HHP) e demonstraram uma melhora na motilidade, integridade de membrana plasmática e integridade de membrana acrossomal da célula espermática aos procedimentos de armazenamento (fresco e criopreservado) e aumentaram a taxa de fertilização (*in vitro* e por inseminação) (Pribenszky et al., 2011; Horvath et al., 2016). Cole e Meyers (2011) utilizaram a pressão osmótica em espermatozoides de primatas durante os procedimentos de criopreservação, o que aumentou a fosforilação da tirosina e, com isso, a capacitação espermática.

10. OZÔNIO

A ozonioterapia tem sido amplamente utilizada como coadjuvante no tratamento em diversas condições, como úlceras cutâneas crônicas, peritonites, feridas infectadas, doenças isquêmicas, problemas articulares, doenças vasculares (isquemia crônica de membros, infarto cardíaco e acidente vascular cerebral) (Hernandez et al., 2005; Bocci et al., 2011). Atua regulando o estresse oxidativo principalmente através da estimulação do sistema antioxidante da célula (Bocci et al., 2011).

O ozônio reage com PUFAS, antioxidantes como os ácidos ascórbico e úrico, compostos tiol com grupos -SH, como cisteína, glutathiona reduzida (GSH) e albumina. Dependendo da dose de ozônio, carboidratos, enzimas, DNA e RNA também podem ser afetados (Bocci., 2006). Todos esses compostos atuam como doadores de elétrons e sofrem oxidação. A molécula ROS fundamental é o peróxido de hidrogênio, que é um oxidante não radical capaz de atuar como mensageiro do ozônio, responsável por desencadear diversos efeitos biológicos e terapêuticos (Bocci et al., 2011)

Tem sido relatado que o ozônio aumenta a atividade de enzimas antioxidantes, como GPx, SOD e CAT (Di Fillipo et al., 2008). Um estudo realizado por Ínal et al (2011) mostrou que o tratamento com ozônio suprime significativamente os níveis de

malondialdeído (MDA), que são subprodutos da peroxidação lipídica (Ínal et al., 2011). Estudos recentes mostraram que o efeito pró-oxidante do ozônio é um meio eficaz de prevenir danos de isquemia e reperfusão (I/R) em vários órgãos, como fígado, pulmão, intestino, ovário e rim (Ho et al., 2013; Haj et al., 2014; Onal et al., 2015; Sayar et al., 2016). A ozonioterapia pode inibir a inflamação e a apoptose após lesão de isquemia e reperfusão renal em ratos. Os níveis aumentados de estresse oxidativo e inflamação (atividade de mieloperoxidase e expressão dos marcadores interleucina-1 beta, fator de necrose tumoral alfa e molécula de adesão intercelular-1) foram reduzidos pela terapia com ozônio (Chen et al., 2008).

Há também utilização da ozonioterapia como efeito protetor nos casos de modelos experimentais de torção testicular, diminuindo a gravidade da lesão de isquemia e reperfusão pela inibição do estresse oxidativo. A ozonioterapia protegeu contra danos em um modelo de torção testicular experimental unilateral em ratos, reduzindo a apoptose e a iNOS e aumentando a atividade da CAT (Ekici et al., 2012; Alpcan et al., 2014; Aydos et al., 2014; Tusat et al., 2017). Salem et al. (2016) avaliaram o efeito protetor do tratamento com ozônio na toxicidade testicular induzida por Adriamicina, demonstrando que a ozonioterapia exibiu efeitos positivos sobre a espermatogênese, viabilidade, e suprimiu o estresse oxidativo aumentando os níveis de antioxidantes, e reduzindo os níveis de MDA e NO.

10.1 MECANISMO DE AÇÃO DO OZÔNIO

O mecanismo pelo qual o ozônio induz uma resposta antioxidante está sendo amplamente estudado (Galiè et al., 2018; Galiè et al., 2019). De acordo com Bocci (2015), pesquisas realizadas partiram do pressuposto de que esses benefícios podem depender da capacidade do estresse oxidativo leve para sustentar vias protetoras por ativação do fator de transcrição nuclear, o fator nuclear eritróide 2 (NrF2) (Bocci, 2015). O NrF2 é um regulador dos genes que protegem as células dos efeitos endógenos e exógenos do estresse oxidativo (Motohashi e Yamamoto, 2004).

A eficácia da terapia com ozônio depende de uma indução ao estresse oxidativo, o qual é capaz de estimular as vias de defesa celular sem causar efeitos deletérios. Doses altas induziram um efeito oxidativo prejudicial à célula, porém baixas concentrações de ozônio induziram um efeito pró-oxidativo, ativando vias

antioxidantes (Galiè et al., 2019).

Em um experimento com células de cultivo HeLA, as quais foram submetidas a um estresse oxidativo e depois tratadas com ozônio, foi observado um aumento da translocação nuclear de NrF2 em locais de cromatina e ativação do gene controlado pelo elemento da resposta antioxidante (ERA). Após a ozonioterapia, a translocação do NrF2 foi significativamente maior quando comparado ao controle. O ozônio também evitou a degradação de NrF2 induzida por Keap 1 (Galiè et al., 2018).

O tratamento sistêmico com ozônio aumentou os níveis de NrF2 nas células mononucleares do sangue periférico de humanos em consequência ocorreu um aumento da atividade da SOD e CAT (Re et al., 2014). O uso de solução salina ozonizada em queratinócitos humanos *in vitro*, para a cicatrização de feridas comprovou a ativação de NrF2, resultando no aumento da expressão do gene HMOX1. A administração sistêmica de ozônio em ratos com doença renal crônica induzida induziu, resultou na ativação do NrF2, tendo regulação positiva de enzimas antioxidantes, e diminuindo a insuficiência renal (Yu et al., 2016). O tratamento em ratos com ozônio induziu uma pró-oxidação ativando o NrF2, protegendo o pulmão e o miocárdio da lesão de isquemia e reperfusão, uma das principais causas de disfunção cardíaca e respiratória durante cirurgias cardiovasculares, transplante cardíaco e procedimentos de circulação extracorpórea (Meng et al., 2017; Wang et al., 2018).

O fator de transcrição NrF2 e seu inibidor Keap1, também atuam na regulação direta da bioenergética mitocondrial. A inibição de NrF2 leva à despolarização mitocondrial, diminuição dos níveis de ATP e diminuição do potencial da membrana mitocondrial, enquanto que a ativação de NrF2 aumentou o potencial da membrana mitocondrial e os níveis de ATP e a eficiência da fosforilação oxidativa. O NrF2 também aumentou a produção de ATP na glicólise, que é usada pela F1Fo-ATPase para manutenção do potencial da membrana mitocondrial (Holmstrom et al., 2013).

A expressão do RNAm do NrF2 apresentou níveis significativamente menores no sêmen de pacientes que apresentavam quadros de oligozoospermia e astenozoospermia. Observou-se, também, correlação positiva entre o nível de expressão do RNAm de NrF2 e parâmetros da função espermática como motilidade progressiva e concentração de espermátózoide, demonstrando que o nível de expressão de RNAm de NrF2 é significativamente menor em homens com baixa

motilidade espermática (Chen et al.,2012). Isto sugere que estimular a expressão de NrF2 com baixas doses de ozônio, melhora parâmetros essenciais como a motilidade progressiva.

11.REFERÊNCIAS

Aitken, R. J.; Curry, B. J. Redox regulation of human sperm function: From the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.14, p. 367–381, 2011

Aitken, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v.7, p.659-668, 1998.

Aitken, R.J. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. **Molecular reproduction e development**, v.84, n.10, p.1039-1052, 2017.

Aitken, R.J.; Lambourne, S.; Gibb, Z.The John Hughes Memorial Lecture: Aspects of Sperm Physiologyd Oxidative Stress and the Functionality of Stallion Spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.34, p.17–27, 2014.

Aitken, R.J.; Harkiss, D.; Knox, W.; Paterson, M.; Irvine, D.S. A new signal transduction cascade in human enabling sperm characterized by a redox and cAMP-regulated tyrosine phosphorylation induction. **Journal of Cell Science**, v.111, p. 645 – 656,1998.

Alpcan, S.; Başar, H.; Aydos, T.R.; Kul, O.; Kisa, Ü.; Başar, M.M. Apoptosis in testicular tissue of rats after vasectomy: evaluation of eNOS, iNOS immune reactivities and the effects of ozone therapy. **Turk J Urol**. v.40, p.199-206, 2014.

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.

Ashrafi, I.; Kohram, H.; Ardabili, F.F. Antioxidant effects of melatonin on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved bull sperm. **Animal Reproduction Science**, v.139, p. 25 – 30, 2013.

Aydos, T.R.; Başar, M.M.; Kul, O.; Atmaca, H.T.; Uzunalioğlu, T.; Kisa, Ü. Effects of ozone therapy and taurine on ischemia/ reperfusion-induced testicular injury in a rat testicular torsion model. **Turk J Med Sci**, v.44, p.749-55, 2014.

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.

Battut, I.B.; Kempfer, A.; Becker, J.; Lebailly, I.; Camugli, S. Development of a new fertility prediction model for stallion semen, including flow cytometry. **Theriogenology**, v.86, p.1111-1131, 2016.

- Baumber, J.; Vo, A.; Sabeur, K.; Ball, B.A. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effects on equine sperm motility. **Theriogenology**, v.57, p.1025 – 1033, 2002.
- Bize, I.; Santander, G.; Cabello, P.; Driscoll, D.; Sharpe, C. Hydrogen peroxide is involved in in vitro hamster sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v. 44, p.398 – 403, 1991.
- Bocci, V.A. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. **Archives of Medical Research**. v.37, n. 4, p.425-435, 2006.
- Bocci, V.; Zanardi, L.; Travagli, V. Oxygen/ozone as a medical gas mixture. A critical evaluation of the various methods clarifies positive and negative aspects. **Medical Gas Research**, v.1, p.1-6. 2011.
- Bocci, V.; Valacchi, G., Nrf2 activation as target to implement therapeutic treatments. **Front Chem**, v.3, p.4, 2015.
- Boerke, A.; Brouwers, J.F.; Olkkonen, V.M.; Van de Lest, C.H.; Sostaric, E.; Schoevers, E.J.; Gadella, B.M. Involvement of bicarbonate-induced radical signaling in oxysterol formation and sterol depletion of mammalian sperm in training during in vitro fertilization. **Biology of Rreproduction**, v.88, p.21, 2013.
- Braun, R.E. Packaging paternal chromosomes with protamine. **Nature Genetics**, v.28, p.10-12, 2001.
- Bucci D.; Isani G.; Spinaci M. Comparative immunolocalization of GLUTs 1, 2, 3 and 5 in boar, stallion and dog spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p.315–322, 2010.
- 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.
- Champe, P. C.; Harvey, R. A.; Ferrier, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, p.534, 2006.
- Chen, H.; Xing, B.; Liu, X. Ozone oxidative preconditioning inhibits inflammation and apoptosis in a rat model of renal ischemia/reperfusion injury. **Eur J Pharmacol**, v.10, p.306–314, 2008.
- Chen, K.; Mai, Z.; Gao, X.; Yu, B. Low NRF2 mRNA expression in spermatozoa from men with low sperm motility. **Tohoku J Exp Med**. v.228 (3), p.259-66, 2012
- Cole, J.A.; Meyers, S.A. Osmotic stress stimulates phosphorylation and cellular expression of heat shock proteins in rhesus macaque sperm. **Journal of Andrology**, v.32, p. 402–410, 2011.
- Di Filippo, C.; Marfella, R.; Capodanno, P.; Ferraraccio, F.; Coppola, L.; Luongo, M. Acute oxygen-ozone administration to rats protects the heart from ischemia reperfusion infarct. **Inflamm Res**. v.57, p.445-449, 2008.
- Dodaran, H.V.; Zhandi, M.; Sharafi, M.; Nejati-Amiri, E., Nejati-Javaremi, A., Mohammadi-Sangcheshmeh, A., Shehab-El-Deen, M.A., Shakeri, M. Effect of ethanol induced mild stress on post-thawed bull sperm quality. **Cryobiology**, v. 71, p.12–17, 2015.
- Ecroyd, H.; Jones, R.C.; Aitken, R.J. Endogenous redox activity in mouse spermatozoa and its role in regulating the tyrosine phosphorylation events associated

- with sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v.69, p. 347 – 354, 2003.
- Ekici, S.; Doğan Ekici, A.I.; Öztürk, G.; Benli Aksungar, F.; Sinanoğlu, O.; Turan, G. Comparison of melatonin and ozone in the prevention of reperfusion injury following unilateral testicular torsion in rats. **Urology**, v.80, p.899-906, 2012.
- Ferramosca, A.; Zara, V. Bioenergetics of mammalian sperm capacitation. **Biomed Research International**, v.2014, p.1-8, 2014.
- Finkel, T.; Holbrook, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v.408, 2000.
- Flesch, 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.
- Florman, H. M.; Jungnickel, M. K.; Sutton, K. A. Regulating the acrosome reaction. **The International Journal of Developmental Biology**, v.52, p.503-510, 2008.
- Gadella, B. M.; Rath, R.; Brouwers, J. F. H. M.; Stout, T. A. E.; Colenbrander, B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.249-265, 2001.
- Galiè, M.; Costanzo, M.; Nodari, A.; Boschi, F.; Calderan, L.; Mannucci, S.; Covi, V.; Tabaracci, G.; Malatesta, M. Mild ozonisation activates antioxidant cell response by the Keap1/Nrf2 dependent pathway. **Free Radical Biology and Medicine**.2018.<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.093>.
- Galiè, M.; Covi, V.; Tabaracci, G.; Malatesta M. The Role of Nrf2 in the Antioxidant Cellular Response to Medical Ozone Exposure. **International Journal of Molecular Sciences**, v.20, p.4009, 2019.[doi:10.3390/ijms20164009](https://doi.org/10.3390/ijms20164009).
- Ghallab, S.M.; Shahat, A.M.; Fadl, M.A.; Ayoub, M.M.; Moawad, A.R. Impact of supplementation of semen extender with antioxidants on the quality of chilled or cryopreserved Arabian stallion spermatozoa. **Cryobiology**, v.79, p.14-20, 2017.
- Gibb, Z.; Aitken, R.J. The Impact of Sperm Metabolism during In Vitro Storage: The Stallion as a Model. **Bio Med Research International**, 2016, [doi: 10.1155/2016/9380609](https://doi.org/10.1155/2016/9380609).
- 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
- Gibb, Z.; Lambourne, S.R.; Quadrelli, J.; Smith, N.D.; Aitken, R.J. L - carnitine and pyruvate are survival factors during stallion sperm storage at room temperature. **Biology of Reproduction**, v. 93, p.104, 2015.
- Graham, J.K. Principles of cooled semen. In: Mckinnon, A.O., Squires, E.L., Vaala, W.E., Varner, D.D. **Equine Reproduction**. 2. ed. West Sussex: Wiley-Blackwell, cap.127, v.1, p.1308-1315, 2011.
- Haj, B.; Sukhotnik, I.; Shaou, I. R.; Pollak, Y.; Coran, A.G.; Bitterman, A. Effect of ozone on intestinal recovery following intestinal ischemia-reperfusion injury in a rat. **Pediatr SurgInt**, v.30, p.1818, 2014.
- Hermo, I.; Pelletier, R. M.; Cyr, D. G.; Smith, C. E. Surfing the Wave, Cycle, Life History, and Genes/Proteins Expressed by Testicular Germ Cells. Part 2: Changes in Spermatid Organelles Associated with Development of Spermatozoa. **Microscopy Research and Technique**, v.73, p.279-319, 2010.

- Hernandez, F.A.; Calunga, J.L.; Turrent, J.; Menendez Cepero, S.; Montenegro Perdomo, A. Ozone therapy effects on biomarkers and lung function in asthma. **Archives of Medical Research - Journal**, v.36, p.549–554, 2005.
- Hezavehei, M.; Kouchesfahani, H.M.; Sharafi, M.; Salekdh, H.; Eftekhari-Yazdi, P. Preconditioning of sperm with sublethal nitrosative stress: a novel approach to improve frozen–thawed sperm function. **RBMO**, v. 36, p.413-425, 2019.
- Ho, E.; Karimi, Galougahi, K.; Liu, C.C.; Bhindi, R.; Figtree, G.A. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. **Redox Biol**, v.1, p.483-91, 2013.
- Ho, H. C.; Suarez, S. S. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. **Reproduction**, v.122, p.519-526, 2001.
- Holmstrom, K. M.; Baird, L.; Zhang, Y.; Hargreaves, I.; Chalasani, A.; Land, J.M.; Stanyer, L.; Yamamoto, M.; Dinkova-Kostova, A.T; Abramov, A.Y. Nrf2 impacts cellular bioenergetics by controlling substrate availability for mitochondrial respiration. **Biol. Open**, v. 2, p.761–770, 2013.
- Horvath, A.; Szenci, O.; Nagy, K.; Vegh, L.; Pribenszky, C.; Stress preconditioning of semen before cryopreservation improves fertility and increases the number of offspring born: A prospective randomised study using a porcine model. **Reproduction, Fertility and Development**, v.28, p. 475–481, 2016.
- Inal, M.; Dokumacioglu, U.M.; Özcelik, E.; Ucar, Ó .The effects of ozone therapy and coenzyme Q₁₀ combination of markers of oxidative stress in healthy individuals. **Ir J Med Sci**, v.180, p.703-707, 2011.
- Jonge, C. D. Biological basis for human capacitation. **Human Reproduction Update**, v.11, n.3, p.205-214, 2005.
- Lewis, B.; Aitken, R.J. Redox-regulated tyrosine phosphorylation cascade in rat sperm. **Journal of Andrology**, v.22, p. 611 - 622, 2001.
- Longobardi, V.; Salzano, A.; Campanile, G.; Marrone, R.; Palumbo, F.; Vitiello, M.; Zullo, G.; Gasparrini, B. Carnitine supplementation decreases capacitation-like changes of frozen-thawed buffalo spermatozoa. **Theriogenology**, v.88, p. 236-243, 2017.
- Loomis, P. R. Advanced methods for handling and preparation of stallion Semen. **Veterinary Clinics North American Equine Practice**, v.22, p. 663-676, 2006.
- Loomis,P.R.; Squires, E.S. Frozen semen management in equine breeding programs. **Theriogenology**, v.64, p.480–491, 2001.
- Maia, M.; Bicudo, S. Radicais livres antioxidantes e função espermática em mamíferos, uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 33, n. 4, p.183-193, 2009.
- Martins, H.S.; Souza, M.R.; Penna, C.F.; da Silva, G.C.; Côrtes, S.F., Stahlberg, R.;Lagares, M.A. Milk, caseinate and lactoferrin addition to equine semen cooling extenders. **Andrologia**, v.48, p.862-868, 2016.
- Meng, W.; Xu, Y.; Li, D.; Zhu, E.; Deng, L.; Liu, Z.; Zhang, G.; Liu, H. Ozone protects rat heart against ischemia-reperfusion injury: A role for oxidative preconditioning in attenuating mitochondrial injury. **Biomed. Pharm**, v.8, p.1090–1097, 2017.
- Miller, D.; Brinkworth, M.; Lles, D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than

the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. **Reproduction**, v.139, n.2, p.287-301, 2010.

Moazamian, R.; Polhemus, A.; Connaughton, H.; Fraser, B.; Whiting, S.; Gharagozloo, P.; Aitken, R.J. Oxidative stress and human sperm: diagnostic and functional significance of aldehydes generated as a result of lipid peroxidation. **Molecular Human Reproduction**, v.21, p.502 - 515, 2015.

Morrell J.M.; Johannisson, A.; Dalin, A.M.; Hammar, L.; Sandebert, T.; Rodriguez-Martinez, H. Sperm morphology and chromatin integrity in Swedish warm blood stallions and their relationship to pregnancy rate. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.50, 2008. Doi: 10.1186 / 1751-0147-50-2

Morrell, J.M.; Richter, J.; Martinsson G.; Stuhmann, G.; Hoogewijs, M.; Roels, K., Dalin, A.M. Pregnancy rates after artificial insemination with cooled stallion spermatozoa either with or without single layer centrifugation. **Theriogenology**, v. 82(8), p.1102-5, 2014.

Motohashi, H.; Yamamoto, M. Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. **Trends Mol Med**, v.10(11), p. 549-57, 2004.

Naz, R. K.; Rajesh, P. B. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/acrosome reaction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.2, n.75, p.1-12, 2004.

Nelson, D. L.; Cox, M. M. **Lehninger Princípios da Bioquímica**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, cap. 19.1, p.786, 2014.

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.

Nogueira, B.G.; Sampaio, B.F.B.; Souza, M.I.L.; Costa e Silva, E.V.; Zúccari, C.E.S.N. Coenzyme Q10 and α -Tocopherol prevent the lipid peroxidation of cooled equine semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v.50, p.1003-1010, 2015.

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.

O'Flaherty, C.; Breininger, E.; Beorlegui, N.; Beconi, M.T. Acrossomic reaction in bovine sperm: role of reactive oxygen species and lactate dehydrogenase C4. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1726, p.96 – 101,2005.

O'Flaherty, C.; de Lamirande, E.; Gagnon, C. Reactive oxygen species modulate independent protein phosphorylation pathways during human sperm capacitation. **Free Radical Biology & Medicine**, v.40, p.1045 – 1055, 2006.

Onal, O.; Yetisir, F.; Salman Sarer, A.E.; Zeybek, N.D.; Oztug Onal, C.; Yurekli, B. Prophylactic ozone administration reduces intestinal mucosa injury induced by intestinal ischemia reperfusion in the rat. **Mediators Inflamm**. 2015. DOI: 792016.

Peña, F.J.; Plaza Davila, M.; Ball, B.; Squires, E.; Martín 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.; Rodríguez Martínez, H.; Tapia, J.A.; Ortega-Ferrusola, C.; González Fernández, I.; Macías García, B. Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: A review. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44, p.345-349, 2009.

- 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.
- Puglia, C.D.; Powell, S.R. Inhibition of cellular antioxidants: a possible mechanism of toxic cell injury. **Environ. Health Persp**, v. 57, p. 307–311, 1984.
- Rahman, M.B.; Vandaele, L.; Rijsselaere, T.; Zhandi, M.; Maes, D.; Shamsuddin, M.; Van Soom, A. Oocyte quality determines bovine embryo development after fertilization with hydrogen peroxide-stressed spermatozoa. **Reprod Fertil Dev**, v.24(4), p.608-18, 2012.
- Re, L.; Martínez-Sánchez G.; Bordicchia, M.; Malcangi, G.; Pocognoli, A.; Morales-Segura, M. A.; Rothchild, J.; Rojas, A. Is ozone pre-conditioning effect linked to Nrf2/EpRE activation pathway in vivo? A preliminar result. **Eur. J. Pharm**, v. 742, p.158–162, 2014.
- Rivlin, J.; Mendel, J.; Rubinstein, S.; Etkovitz, N.; Breitbart, H. Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. **Biology of reproduction**, v.70, p.518 – 522, 2004.
- Salem, E.A.; Salem N.A.; Hellstrom, W.J. Therapeutic effect of ozone and rutin on adriamycin induced testicular toxicity in an experimental rat model. **Andrology**. 2016. Doi: 10.1111/and.12603
- Sayar, I.; Bicer, S.; Gursul, C.; Gürbüz, M.; Peker, K.; Işık, A. Protective effects of ellagic acid and ozone on rat ovaries with an ischemia/reperfusion injury. **J Obstet Gynaecol Res**, v. 42, p.52-8, 2016.
- 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.
- Sikka, S.C. Andrology Lab corner: role of oxidative Stress and Antioxidants in Andrology an assisted reproductive technology. **Journal of Andrology**, v.25, n.1, p. 5-18, 2010.
- Silva, E.C.B.; Guerra, M.M.P. Reactive oxygen and nitrogen species: production and effects on the structural and functional integrity of sperm. **Veterinary Science in the tropics**, v.13, p.9-16, 2010.
- Squires, E.L.; Pickett, B.W.; Graham, J.K.; Vanderwall, D.K.; Mccue, P.M.; Bruemmer, J.E. Cooled and frozen stallion semen.1999. **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory. Fort Collins, Bulletin** v.9, p.01-38, 1999.
- Storey, B. T. Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe. **International Journal of Developmental Biology**, v. 52(5-6), p. 427–437, 2008. doi: 10.1387/ijdb.072522bs
- Tusat, M.; Mentese, A.; Demir, S.; Alver, A.; Imamoglu, M. 2017. Medical ozone therapy reduces oxidative stress and testicular damage in an experimental model of testicular torsion in rats. **Int Braz J Urol**. v. 43, p. 1160-1166, 2017.
- Wang, Z.; Zhang, A.; Meng, W.; Wang, T.; Li, D.; Liu, Z.; Liu, H. Ozone protects the rat lung from ischemia-reperfusion injury by attenuating NLRP3-mediated inflammation, enhancing Nrf2 antioxidant activity and inhibiting apoptosis. **Eur. J. Pharm**. v.835, p.82–93, 2018.

Yu, G.; Liu, X.; Chen, Z.; Chen, H.; Wang, L.; Wang, Z.; Qiu, T.; Weng, X. Ozone therapy could attenuate túbulo interstitial injury in adenine-induced CKD rats by mediating Nrf2 and NF- κ B. **J. Basic. Med. Sci**, v.19, p.1136–1143, 2016.

CAPÍTULO 2- ARTIGO

O Efeito do Ozônio na refrigeração do sêmen equino

Raiza Rocha Pereira^a, Breno Fernandes Barreto Sampaio^b

^aMestranda do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal / UFMS; email: raiza_rochapereira@hotmail.com

^bDocente da FAMEZ / UFMS, e-mail: breno.sampaio@ufms.com.br

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da ozonioterapia na qualidade espermática do sêmen equino refrigerado. Utilizaram-se cinco garanhões, sendo quatro ejaculados de cada. Após a colheita, os ejaculados foram divididos em cinco grupos, um controle (sem adição de ozônio) e outros quatro adicionou-se ao meio de refrigeração diferentes concentrações de ozônio: 5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 30 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 60 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (O₃-5, O₃-15, O₃-30, O₃-60 respectivamente). Após a adição do tratamento foram acondicionadas por 24 h e 48 h sob a temperatura de 5°C na caixa de refrigeração Botuflex (Botupharma®, Botucatu, São Paulo, Brasil). As análises espermáticas das amostras de sêmen ocorreram nos momentos 24 h (M24) e 48 h (M48) de refrigeração a 5°C e após estresse térmico de 37°C por 30 minutos (M24-30 e M48-30, respectivamente após 24 h e após 48 h de refrigeração). A cinética espermática realizou-se pela análise computadorizada do sêmen e as avaliações de lesões de membranas e peroxidação lipídica por citometria de fluxo. De acordo com os resultados, a adição de ozônio na concentração de 15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, após 24 h de refrigeração determinou aumento nos parâmetros de motilidade total e progressiva do sêmen equino refrigerado comparada ao controle e aos grupos 30 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 60 $\mu\text{g}/\text{m}^3$; já a concentração de 5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ apresentou melhora significativa em relação ao controle, 30 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 60 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, na integridade de membranas plasmática e acrossomal. Na avaliação de 48 h de refrigeração a adição de 5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ apresentou maiores resultados de porcentagem de espermatozoides rápidos e integridade de membrana em relação aos demais nos dois momentos avaliados. Há uma queda da cinética e integridade de membrana nas maiores concentrações (30 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 60 $\mu\text{g}/\text{m}^3$). Portanto, o efeito do ozônio em baixas concentrações (5 e 15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) conferiu proteção ao espermatozoide equino refrigerado, melhorando os parâmetros cinéticos de

motilidade total e progressiva, e aumentando a integridade de membrana plasmática e acrossomal.

Palavras-chave: Espermatozoide, Garanhão, oxidante.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the effect of ozone therapy on the sperm quality of refrigerated equine semen. Five stallions were used, four of which were ejaculated from each. After the collect, the ejaculates were divided into five groups, control (without addition of ozone) and four other groups in which different concentrations of ozone were added to the cooling medium: 5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 30 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ and 60 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (O_3 -5, O_3 -15, O_3 -30, O_3 -60 respectively). The sperm analysis of the semen samples took place at 24 h (M24) and 48 h (M48) cooling at 5°C and after thermal stress of 37°C for 30 minutes (M24-30 and M48-30, respectively after 24 h and after 48 h of cooling). Sperm kinetics were performed by computerized semen analysis and the evaluation of membrane lesions and lipid peroxidation by flow cytometry. According to the results, the addition of ozone at a concentration of 15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, after 24 h of refrigeration demonstrated an increase in the parameters of total and progressive motility of refrigerated equine semen compared to the control and to the groups 30 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ and 60 $\mu\text{g}/\text{m}^3$; the concentration of 5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ showed significant improvement in relation to the control, 30 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ and 60 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, in the integrity of the plasma and acrosomal membrane. In the evaluation of 48 h of refrigeration, the addition of 5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ and 15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ presented higher results of percentage of fast sperm and membrane integrity in relation to the others in the two evaluated moments. There is also a drop in membrane kinetics and integrity at the highest concentrations (30 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ and 60 $\mu\text{g}/\text{m}^3$). Therefore, the effect of ozone in low concentrations (5 and 15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) provided protection to the chilled equine sperm, improving the kinetic parameters of total and progressive motility, and increasing the integrity of the plasma and acrosomal membrane.

Keywords: Sperm, Stallion, oxidant.

1.Introdução

A inseminação artificial (IA) com sêmen resfriado equino, e umas das biotecnologias mais importantes na reprodução equina, pois possibilita um maior desenvolvimento do setor através do ganho na eficiência reprodutiva, prevenção de doenças, variabilidade genética, etc [1]. Porém, o tipo de seleção realizada para a reprodução em equinos pode comprometer o sucesso da refrigeração do sêmen, visto que, em geral, a escolha de um garanhão é baseada principalmente no desempenho físico ou desportivo, deixando o potencial reprodutivo em segundo plano [2]. Esse fato resulta na heterogeneidade reprodutiva de garanhões, que por sua vez pode levar ao uso reprodutores que não apresentam bons resultados na refrigeração. Estima-se que somente 30 a 40% dos garanhões produzem células adequadas que resistem aos procedimentos em baixas temperaturas [3]. Assim, melhorias nos procedimentos de refrigeração aumentariam a eficiência da técnica.

O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (ROS), e as defesas antioxidantes das células. A vulnerabilidade dos espermatozoides ao estresse oxidativo é, em grande parte, consequência de sua estrutura anatômica e composição bioquímica altamente especializadas [4]. Os espermatozoides equinos apresentam quantidades elevadas de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS) nas membranas, que os tornam mais sensíveis ao estresse oxidativo, pois as ligações carbono-hidrogênio adjacentes às ligações duplas são mais instáveis e mais susceptíveis ao sequestro de hidrogênio pelas espécies reativas de oxigênio ROS [5]. A maioria das células somáticas possui um espaço citoplasmático abundante para abrigar suas enzimas antioxidantes, já as células espermáticas possuem um citoplasma limitado, sendo sua porção mais abundante na peça intermediária [4]. Assim, diversos estudos vêm acrescentando antioxidantes aos meios diluidores na tentativa de atenuar ou, até mesmo, neutralizar os efeitos nocivos das ROS [6-9].

A ozonioterapia tem sido amplamente utilizada como pró-oxidante, e tem demonstrado em seus resultados um efeito positivo em diversas condições, como controle da dor [10], doenças gastrointestinais [11], doenças pulmonares [12-13], diabetes [14], doenças isquêmicas [15], câncer [16-17], doenças infecciosas [18-19] e odontologia [20-22]. A ozonioterapia é realizada com uma mistura de gases: 5% de

O₃ (ozônio) e 95% de O₂ (oxigênio). O ozônio é um gás instável, formado pela combinação de três átomos de oxigênio em uma estrutura cíclica. Embora o ozônio não seja uma molécula radical, é o terceiro oxidante mais potente após flúor e persulfato. No entanto, quando o ozônio é utilizado em pequenas doses atua como pró-oxidante, estimulando assim uma forte resposta antioxidante [23]. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da ozonioterapia na qualidade espermática do sêmen equino refrigerado.

2. Material e Métodos

2.1 Aspectos éticos

Estudo realizado de acordo com preceitos éticos recomendados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), após aprovação pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMS, sob protocolo nº 913/2017.

2.2 Ozônio

O gerador de Ozônio (O₃) Ozone & life ®1.5 portátil (Ozone & life, São José dos Campos, São Paulo Brasil) foi calibrado para as concentrações de 5µg/m³, 15µg/m³, 30µg/m³ e 60 g/m³.

2.3 Animais

Experimento realizado utilizando coletas de cinco garanhões adultos (Raças Quarto de milha n=3, Paint Horse n=1, Pantaneiro n=1) de idade entre 3 a 10 anos, férteis, localizados em Haras próximo a Campo Grande/MS. O processamento e as análises laboratoriais realizados no Laboratório Multiuso da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

2.4 Colheita, Processamento e Refrigeração do Sêmen.

Realizadas quatro colheitas de cada garanhão (n=20), utilizando vagina artificial modelo Botucatu (Botupharma®, Botucatu, São Paulo, Brasil), mantida a uma temperatura entre 42 e 45°C. As colheitas ocorreram com o auxílio de uma fêmea em cio. As amostras de sêmen mantidas em banho-maria a 37°C foram submetidas à análise das variáveis macroscópicas (volume, aspecto e cor) e microscópicas (motilidade, vigor, concentração), diluídas em meio a base de leite desnatado e antibióticos, Inra 96® (IMV Technologies) na concentração de (1:1) e transportadas

em caixa de refrigeração Botubox (Botupharma®, Botucatu, São Paulo, Brasil) para o laboratório de processamento e análises.

O ejaculado foi centrifugado a 600g/10 min e ressuspendido na concentração de 50×10^6 sptz/ml, em meio a base de leite desnatado e antibióticos, Inra 96® (IMV Technologies), e realizou-se uma análise pré-refrigeração, e então divididos em 5 grupos experimentais: Controle - Inra 96®; O3-5 - Inra 96® + $5 \mu\text{g}/\text{m}^3$; O3-15 - Inra 96® + $15 \mu\text{g}/\text{m}^3$; O3-30 - Inra 96® + $30 \mu\text{g}/\text{m}^3$; O3-60 - Inra 96® + $60 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de Ozônio. Para cada amostra tratada, o ozônio foi adicionado ao sêmen com o auxílio de uma seringa acoplada no gerador de ozônio, na proporção de 1:1 e homogeneizado de forma lenta por 30 segundos. Após a adição do tratamento foram acondicionadas por 24 h e 48 h sob a temperatura de 5°C na caixa de refrigeração Botuflex (Botupharma®, Botucatu, São Paulo, Brasil), segundo metodologia utilizada por Hartwig et al [9].

2.5 Análises espermáticas

As análises espermáticas ocorreram nos momentos 24 h (M24) e 48 h (M48) de refrigeração a 5°C e após incubação a 37°C por 30 minutos (M24-30 e M48-30, respectivamente após 24 h e após 48 h de refrigeração).

2.5.1 Cinética espermática

Avaliados pelo sistema computadorizado CASA (modelo Sperm Class Analyzer - SCA) os parâmetros de cinética espermática, motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade de trajeto (VAP), velocidade retilínea (VSL), velocidade curvilínea (VCL), retilinearidade (STR) e rápidos. Para essa avaliação colocou-se 5,0µL de sêmen na câmara de Makler previamente aquecida a 37°C, as configurações do CASA usado neste estudo estão descritas no Quadro 1.

Quadro 1. Ajuste do sistema computadorizado CASA (modelo Sperm Class Analyzer - SCA) para as realizações das análises seminais em equídeos.

Parâmetros	Ajustes
Número de imagens adquiridas	40
Taxa de aquisição de imagens	60 Hertz
Contraste mínimo da célula	75 pixels
Tamanho mínimo da célula	4 pixels
Contraste para células imóveis	5 pixels
Intensidade para células imóveis	110
Limite para velocidade média do percurso.	50µ/s
Limite para índice retilíneo	80%
Referência de Vap para células lentas	30µ/s
Referência de VSL para células lentas	0,0µ/s
Limite superior de tamanho da célula	2,99
Limite inferior de tamanho da célula	0,59
Limite superior da intensidade estática da célula	1,74
Limite inferior da intensidade estática da célula	0,68
Limite superior de alongamento da célula	97%
Limite inferior de alongamento da célula	12%
Temperatura	37°C

2.5.2 Citometria de Fluxo

Para a avaliação espermática por citometria de fluxo foi utilizado o equipamento CytoFLEX® (Beckman Coulter, Pasadena, Califórnia, EUA) equipado com laser: violeta 405 nm, azul 488 nm e vermelho 638 nm e 12 canais de detecção de fluorescência. Após a análise, avaliou-se os dados pelo programa do mesmo fabricante CytExpert Acquisition software.

A avaliação de integridade de membrana plasmática e acrossomal, ocorreu pela associação de Hoechst 33342 (H342), iodeto de propídio (PI) e FITC-PNA (aglutinina de Peanut conjugada ao isotiocianato de fluoresceína) de acordo com Freitas-Dell'Aqua et al. [25], modificado pela adição da sonda MitoStatus Red (MST) seguindo método de Camargo et al. [26]. Em uma amostra de 200 µL de sêmen diluído em TALP-PVA, na concentração de 5×10^6 espermatozoides/mL adicionou-se 7 µM de H342, 1,5 µM de PI, 2 ng de FITC-PNA e 20 nM de MST, incubando-se durante 20 min à 37°C ao abrigo da luz. Ao término deste período, a amostra foi avaliada no citômetro de fluxo.

Para a avaliação de fluidez de membrana (Hoechst, Yopro e Merocianina), diluiu-se as amostras de sêmen em TALP-PVA na concentração de 5×10^6 espermatozoides/mL, em 200 µL dessa solução acrescentou-se 7 µM de Hoechst

3342, 7,5 μM de Merocianina (M24571 – Life Technologies) e 25 nM de Yopro (Y3603 – Life Technologies) incubados por 20 minutos a 37°C ao abrigo da Luz.

Para a peroxidação lipídica, utilizou-se protocolo de Guasti et al. [27] com a sonda C11-BODYPY (D-3861; Molecular Probes). Em 500 μL de sêmen diluído em TALP-PVA foi adicionado 5 μM de C11-BODIPY581/591, seguido por incubação por 30 minutos a 37 °C. Após a incubação, foram realizadas duas lavagens consecutivas por centrifugação a 300g por 5 minutos, com TALP-PVA e o pellet ressuspendido em 500 μl de TALP-PVA.

2.6 Análise estatística

O delineamento experimental ocorreu em forma de parcelas subdivididas, considerando-se a adição de ozônio O_3 , 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 University, 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 ($x/100$).

3. Resultados

Os resultados obtidos da estatística descritiva durante as análises pré-refrigeração, sem adição de ozônio estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1; Parâmetros da qualidade do sêmen equino pré-refrigeração (n=20) e variabilidade dos parâmetros da qualidade do sêmen (CV%), obtidos com Sperm Class Analyser (SCA) e Citometria de fluxo.

	Unidade	Média ± EP	Min-máx	CV
SCA				
Motilidade total	%	63.9 ± 4.6	43-84	7.2
Motilidade progressiva	%	54.5 ± 4.9	24-78	9
VAP	µm/s	51.9 ± 3.2	32.3-79.7	6.1
VSL	µm/s	37.9 ± 3.2	19.8-55.3	6.1
VCL	µm/s	139.1 ± 50.1	64.7-108.8	36
STR	%	73.5 ± 4.4	66.1 – 86.7	5.9
Rápidos	%	51.4 ± 3.7	15.3-73.9	7.3
Citometria de fluxo				
Membrana plasmática íntegra com membrana acrossomal íntegra	%	71.6 ± 2.6	50.8 -90.2	3.6
Membrana plasmática íntegra e estável.	%	28.2 ± 5.4	23.2-91.8	19.1
Alto potencial da membrana mitocondrial.	%	34.9 ± 7.0	50.0-89.0	20.0
Peroxidação lipídica (UA)	%	5349.3±520.5	2904-9059	9.7

UA: unidade arbitrária.

As análises do momento M 24 demonstraram que o tratamento O₃-15 teve um efeito positivo nos parâmetros de motilidade total e progressiva. O tratamento O₃-5 aumentou a integridade da membrana plasmática com membrana acrossomal íntegra em relação ao controle, O₃-30 e O₃-60. O tratamento O₃-5 também obteve a maior porcentagem de espermatozoides considerados rápidos, quando comparados com o controle, O₃-30, O₃-60. Não ocorreram diferenças significativas nos demais parâmetros avaliados (Tabela 2).

Tabela 2. Parâmetros espermáticos (MEAN± SEM) do sêmen equino refrigerado dos grupos controle e diferentes concentrações de O₃ ozônio O₃-5, O₃-15, O₃-30, O₃-60 avaliados após 24 h de refrigeração (M 24).

M 24					
	Controle	O₃-5	O₃-15	O₃-30	O₃-60
MT%	54.9 ± 4 ^b	55.8 ± 5 ^{ab}	60.3 ± 3 ^a	53.8 ± 2.3 ^b	52.8 ± 4 ^b
MP%	35.0 ± 4.4 ^b	36.8 ± 4.7 ^{ab}	40.7 ± 3.4 ^a	34.1 ± 4 ^b	34.0 ± 3.8 ^b
VCL (µm/s)	61.9 ± 0.8	68.8 ± 3.2	67.9 ± 2	66.8 ± 3.6	64.2 ± 2.5
VSL (µm/s)	24.8 ± 1.4	26.9 ± 2.3	29.1 ± 1.5	27.8 ± 2.4	27.1 ± 1.5
VAP (µm/s)	31.8 ± 1.6	36.2 ± 2.1	36.5 ± 1.7	34.9 ± 2.7	33.7 ± 1.6
LIN (%)	39.7 ± 1	40.6 ± 1.5	42.3 ± 1.3	40.7 ± 1.4	41.8 ± 1.2
STR (%)	77.5 ± 1.2	73 ± 4.6	75.6 ± 4.7	79 ± 0.9	79.8 ± 1.1
Rápidos(%)	24.2 ± 3.3 ^b	28.0 ± 3.5 ^a	27.5 ± 2.8 ^{ab}	24.2 ± 3.8 ^b	21.3 ± 3.0 ^b
MPIAI(%)	46.1 ± 3.9 ^b	51.1 ± 3.6 ^a	47.2 ± 3.1 ^{ab}	45.9 ± .2 ^b	43.1 ± 2.8 ^b
YP-Mero-(%)	28.9 ± 4.4	27.4 ± 5.1	27.1 ± 5.6	28.9 ± 5.2	27.6 ± 5.4
PM ⁺ (%)	72.8 ± 5.5	70.3 ± 5.9	73.6 ± 5.5	68.7 ± 6.8	69.5 ± 6.3
PER (UA)	4971.4 ± 184.8	4980.3 ± 158.2	4957.1 ± 163.5	5273.7 ± 193.9	5235.8 ± 322.9

Motilidade espermática total (MT); Motilidade espermática progressiva (MP); Velocidade curvilínea (VCL); Velocidade retilínea (VSL); Velocidade de trajeto (VAP); Amplitude lateral de cabeça (ALH); Linearidade (LIN); Retilinearidade (STR); Membrana plasmática e membrana acrossomal íntegra (MPIAI); Células íntegras (YP- Mero -); Alto potencial da membrana mitocondrial (PM⁺); Peroxidado (Per); Unidade arbitrária (UA). Letras diferentes nas linhas indicam diferenças estatísticas entre tratamentos (p<0,05).

O tratamento O₃-60 no momento M24-30 apresentou espermatozoides com alta retilinearidade e linearidade, porém a porcentagem de espermatozoides com movimentos rápidos foi a menor entre tratamentos. O tratamento O₃-5 diferiu significativamente dos tratamentos controle, O₃-30 e O₃-60 quanto à integridade da membrana plasmática com membrana acrossomal íntegra; os demais parâmetros da qualidade espermática avaliados não foram significativamente diferentes (Tabela 3).

Tabela 3. Parâmetros espermáticos (MEAN± SEM) do sêmen equino refrigerado dos grupos controle e as e as diferentes concentrações de O₃ Ozônio O₃-5, O₃-15, O₃-30, O₃-60, após 24 h de refrigeração e submetidos a estresse térmico pela incubação por 30 minutos a 37°C (M 24-30).

	M 24- 30				
	Controle	O3-5	O3-15	O3-30	O3-60
MT%	44.4 ± 4.6	44.9 ± 5.2	47.4 ± 4.6	42.7 ± 4.1	40.6 ± 4.3
MP%	28.7 ± 4.1	31.4 ± 4.3	28.8 ± 4.1	23.4 ± 3.3	22.9 ± 3.6
VCL (µm/s)	63.3 ± 2.9 ^a	68.5 ± 3.2 ^a	63.5 ± 3.3 ^a	58.7 ± 2.7 ^b	56.9 ± 1.9 ^b
VSL (µm/s)	23.3 ± 2.1	25.9 ± 2.4	24.6 ± 2.3	22.0 ± 2.1	23.4 ± 2.2
VAP (µm/s)	33.1 ± 1.7	36.3 ± 2.2	33.7 ± 2.1	30.3 ± 1.9	31.6 ± 1.5
LIN (%)	38.9 ± 0.9 ^a	41.2 ± 1.0 ^{ab}	41.9 ± 1.3 ^{ab}	39.9 ± 1.6 ^a	45.3 ± 2.0 ^b
STR (%)	69.2 ± 5.3 ^a	70.4 ± 5.7 ^{ab}	71.4 ± 5.4 ^{ab}	69.8 ± 5.7 ^a	78.1 ± 1.5 ^b
Rápidos(%)	19.5 ± 3.2 ^{bc}	25.6 ± 3.7 ^a	21.5 ± 3.8 ^b	16.6 ± 2.2 ^c	12.6 ± 2.6 ^d
MPIAI (%)	32.4 ± 2.6 ^b	43.4 ± 3.1 ^a	38.7 ± 3.0 ^{ab}	33.7 ± 2.2 ^b	34.0 ± 2.4 ^b
YP-Mero- (%)	27.2 ± 6.0	27.0 ± 6.1	33.2 ± 6.7	29.0 ± 5.8	25.0 ± 5.5
PM+ (%)	72.3 ± 5.2	68.9 ± 7.0	69.1 ± 7.3	74.1 ± 5.2	73.5 ± 6.1
Per (UA)	5764.0±311.2	5367.0±276.0	5327.6±328.7	5454.3±230.9	5476.8±211.2

Motilidade espermática total (MT); Motilidade espermática progressiva (MP); Velocidade curvilínea (VCL); Velocidade retilínea (VSL); Velocidade de trajeto (VAP); Amplitude lateral de cabeça (ALH); Linearidade (LIN); Retilinearidade (STR); Membrana plasmática e membrana acrossomal íntegra (MPIAI); Células íntegras (YP- Mero -); Alto potencial da membrana mitocondrial (PM⁺); Peroxidado (Per); Unidade arbitrária (UA). Letras diferentes nas linhas indicam diferenças estatísticas entre tratamentos (p<0,05).

No momento M 48, o tratamento O₃-60 e teve efeito prejudicial na motilidade total e progressiva, e também nos parâmetros da qualidade do movimento espermático (VCL, VSL, VAP e Rápidos). O tratamento ozônio O₃-5, melhorou a integridade da membrana plasmática com membrana acrossomal íntegra quando comparado ao controle, O₃-30 e O₃-60. As demais variáveis avaliadas, células íntegras sem indicativo de capacitação e alto potencial da membrana mitocondrial não apresentaram diferenças significativas (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros espermáticos (MEAN± SEM) do sêmen equino refrigerado dos grupos controle em diferentes concentrações de O₃ Ozônio O₃-5, O₃-15, O₃-30, O₃-60 avaliados após 48h de refrigeração (M 48).

M 48					
	Controle	O₃-5	O₃-15	O₃-30	O₃-60
MT%	53.6 ± 4.5 ^a	54.7 ± 4.2 ^a	54.4 ± 4.3 ^a	47.3 ± 3.3 ^b	36.8 ± 3.9 ^c
MP%	36.4 ± 4.0 ^a	38.3 ± 4.1 ^a	38.2 ± 4.0 ^a	27.1 ± 3.5 ^b	19.3 ± 3.2 ^c
VCL (µm/s)	70.9 ± 4.0 ^b	74.1 ± 3.1 ^a	72.1 ± 2.6 ^{ab}	63.9 ± 3.3 ^c	57.4 ± 3.4 ^c
VSL (µm/s)	29.2 ± 1.4 ^a	31.1 ± 1.8 ^a	30.4 ± 1.9 ^a	25.3 ± 1.9 ^b	22.6 ± 1.8 ^b
VAP (µm/s)	38.2 ± 1.8 ^b	40.1 ± 2.2 ^a	39.2 ± 2.4 ^{ab}	33.1 ± 2.6 ^c	29.4 ± 2.3 ^c
LIN (%)	40.1 ± 0.8	41.5 ± 1.2	41.5 ± 1.3	43.1 ± 1.3	38.5 ± 1.7
STR (%)	76.6 ± 0.7	74.0 ± 3.1	77.3 ± 0.1	76.4 ± 1.1	76.1 ± 1.7
Rápidos(%)	27.7 ± 3.4 ^a	29.8 ± 3.7 ^a	27.3 ± 3.3 ^a	19.1 ± 3.1 ^b	11.2 ± 2.4 ^c
MPIAI(%)	36.1 ± 3.0 ^b	40.4 ± 3.4 ^a	37.4 ± 3. ^{ab}	36.5 ± 3.3 ^b	29.6 ± 2.5 ^c
YP-Mero-(%)	22.5 ± 6.6	23.7 ± 5.4	21.0 ± 3.2	21.8 ± 4.1	20.9 ± 4.3
PM ⁺ (%)	77.8 ± 5.3	73.1 ± 6.6	74.8 ± 5.4	77.2 ± 5.7	79.4 ± 5.0
PER (UA)	5082.3±203.4	5096.3±149.3	5283.2±190.8	5374.5±243.6	5397.3±213.6

Motilidade espermática total (MT); Motilidade espermática progressiva (MP); Velocidade curvilínea (VCL); Velocidade retilínea (VSL); Velocidade de trajeto (VAP); Amplitude lateral de cabeça (ALH); Linearidade (LIN); Retilinearidade (STR); Membrana plasmática e membrana acrossomal íntegra (MPIAI); Células íntegras (YP- Mero -); Alto potencial da membrana mitocondrial (PM⁺) ; Peroxidado (Per); Unidade arbitrária (UA). Letras diferentes nas linhas indicam diferenças estatísticas entre tratamentos (p<0,05).

O grupo O₃-60 de maior concentração de ozônio diminuiu significativamente os parâmetros de motilidade total e progressiva no momento M48-30. Ocorreram diferenças significativas dos tratamentos do ozônio O₃-5 e O₃-15 com o grupo controle, conferindo assim um efeito protetor da integridade de membrana plasmática e membrana acrossomal. Os demais parâmetros analisados não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos e o grupo controle (Tabela 5).

Tabela 5. Parâmetros espermáticos (MEAN± SEM) do sêmen equino refrigerado dos grupos controle em diferentes concentrações de O₃ Ozônio O₃-5, O₃-15, O₃-30, O₃-60 avaliados após 48h de refrigeração (M48) e submetidos a estresse térmico pela incubação por 30 minutos a 37°C.

M 48- 30					
	Controle	O₃-5	O₃-15	O₃-30	O₃-60
MT%	35.2 ± 4.7 ^{ab}	39.4 ± 3.7 ^a	35.8 ± 5.1 ^{ab}	34.8 ± 4.3 ^b	24.4 ± 4.2 ^c
MP%	23.9 ± 3.7 ^{ab}	27.5 ± 2.9 ^a	22.9 ± 3.9 ^{ab}	20.5 ± 3.7 ^b	12.5 ± 2.9 ^c
VCL (µm/s)	62.2 ± 2.4 ^a	62.8 ± 2.3 ^a	61.9 ± 2.5 ^a	58 ± 2.9 ^a	50.2 ± 3.2 ^b
VSL (µm/s)	23.7 ± 1.8 ^{ab}	26.3 ± 2.1 ^b	23.8 ± 2.1 ^{ab}	23.4 ± 2.4 ^{ab}	21.2 ± 2.3 ^b
VAP (µm/s)	32.1 ± 1.5 ^{ab}	34.1 ± 2.0 ^a	32.9 ± 1.9 ^{ab}	31.1 ± 2.5 ^{ab}	26.7 ± 2.1 ^{ab}
LIN (%)	39.8 ± 1.6	43.2 ± 1.5	41.8 ± 1.1	40.5 ± 2.2	63.4 ± 2.2
STR (%)	73.1 ± 4.0	76.4 ± 3.9	71.3 ± 5.3	72.7 ± 4.1	70.0 ± 5.6
Rápidos(%)	16.8 ± 3.2 ^a	17.3±2.3 ^a	14.6±2.9 ^b	13.5±3.2 ^b	7.4±2.3 ^c
MPIAI (%)	27.9 ± 2.3 ^b	35.0 ± 2.4 ^a	33.6 ± 3.6 ^a	28.5 ± 3.0 ^b	24.9 ± 2.0 ^c
YP-Mero- (%)	20.8 ± 4.3	17.7± 4.5	20.3 ± 5.6	18.8 ± 4.5	17.7± 5.9
PM+ (%)	76.6 ± 5.0	77.4 ± 5.3	73.5 ± 5.9	79.3 ± 4.5	81.6 ± 4.2
Per (UA)	5606.0±308.6	5210.4± 262.5	5505.1±251.4	5505.1± 143.5	55474.0±226.9

Motilidade espermática total (MT); Motilidade espermática progressiva (MP); Velocidade curvilínea (VCL); Velocidade retilínea (VSL); Velocidade de trajeto (VAP); Amplitude lateral de cabeça (ALH); Linearidade (LIN); Retilinearidade (STR); Membrana plasmática e membrana acrossomal íntegra (MPIAI); Células íntegras (YP- Mero -); Alto potencial da membrana mitocondrial (PM⁺); Peroxidado (Per); Unidade arbitrária (UA). Letras diferentes nas linhas indicam diferenças estatísticas entre tratamentos (p<0,05).

4. Discussão

A eficácia da terapia do ozônio depende de indução da pró-oxidação, o qual é capaz de estimular as vias de defesa celular sem causar efeitos deletérios. O ozônio ativa a transcrição do RNAm do fator de transcrição NrF2, direcionado pelo estímulo à resposta antioxidante de maneira dependente da dose. Altas concentrações induzem um efeito oxidativo prejudicial à célula e baixas concentrações de ozônio induzem um efeito pró-oxidativo, ativando vias antioxidantes [28,29,30]. Este resultado dose-dependente também foi testado no presente experimento, as maiores doses de ozônio testadas (O_3 -30 e O_3 -60), em alguns momentos, obtiveram resultados negativos em relação à qualidade da cinética espermática e da integridade da membrana plasmática, demonstrando uma certa toxicidade à célula espermática. Porém, as baixas doses do tratamento com ozônio (O_3 -5 e O_3 -15), estas têm resultados significativos em relação à motilidade total e progressiva, e à integridade da membrana plasmática com membrana acrossomal íntegra.

No presente experimento, ocorreu um aumento da cinética espermática nos tratamentos com baixas doses de O_3 (O_3 -5 e O_3 -15) quando comparados ao controle. O aumento da motilidade dos tratamentos com ozônio (O_3 -5 e O_3 -15) neste experimento pode ser correlacionado com fator de transcrição NrF2 e seu inibidor Keap1, que controlam os genes antioxidantes e também atuam na regulação da bioenergética mitocondrial [33-34]. A expressão do RNAm do gene antioxidante NrF2 apresentou níveis significativamente menores no sêmen humano de pacientes que apresentavam quadros de oligozoospermia e astenozoospermia [35]. A substância pró-oxidante adicionada ao sêmen óxido nítrico na dose subletal (NO -0.01 μ M) antes da criopreservação dos espermatozoides de humanos também melhorou significativamente a motilidade total e motilidade progressiva pós descongelamento [31]. Sharafi et al., 2015 [32] utilizaram em seu experimento o óxido nítrico antes da criopreservação do sêmen bovino e tiveram como resultado na dose subletal (NO -1 μ M) aumentos na motilidade total e progressiva, integridade de membrana plasmática e diminuição de células espermáticas apoptóticas.

A perda de motilidade é uma consequência e não uma causa de estresse oxidativo. A diminuição da motilidade espermática associada às ROS ocorre na ausência de qualquer diminuição detectável na integridade da membrana plasmática, integridade acrossomal ou potencial de membrana mitocondrial [4]. Portanto, a

motilidade dos espermatozoides parece ser um indicador sensível do estresse oxidativo e pode ser um dos primeiros parâmetros afetados durante o estresse oxidativo [4]. Como observado neste experimento a dose deletéria do tratamento com ozônio O₃-60 (60µg/ml) diminuiu motilidade total e progressiva, mas não aumentou a peroxidação lipídica, demonstrando assim essa sensibilidade da motilidade frente a uma alta dose oxidante.

Trabalhos realizados com ozônio demonstraram que a ozonioterapia suprimiu o malandialdeído o principal subproduto da peroxidação lipídica [36-37]. Porém neste trabalho com células espermáticas refrigeradas, a peroxidação lipídica não diferiu entre os tratamentos em nenhum dos momentos testado. Este experimento está de acordo com Kankofer et al. [38] que avaliaram a intensidade da peroxidação lipídica no sêmen de garanhão armazenados a 5°C e concluíram que esta variável não aumenta substancialmente durante a refrigeração.

Os espermatozoides equinos apresentam quantidades elevadas de PUFAS nas membranas e baixa porcentagem de colesterol (13%), quando comparado a outras espécies [39]. A baixa proporção de colesterol/fosfolipídios pode levar a alterações na fluidez e estabilidade promovendo áreas de fragilidade na membrana, sujeitas a rupturas e permeabilidade a íons durante o armazenamento em baixas temperaturas [4]. O tratamento com ozônio (O₃-5) neste experimento conferiu a célula espermática maior integridade de membrana plasmática e acrossomal em todos os momentos analisados, demonstrando que este tratamento pode ser realizado nas células espermáticas durante o procedimento de refrigeração.

O estresse térmico submetido aos espermatozoides, neste experimento, em todos os grupos avaliados diminuiu os parâmetros de cinética espermática, integridade das membranas plasmáticas e acrossomais e aumentando os parâmetros de peroxidação lipídica. Este resultado deve-se pelo fato de que o estresse térmico promove decréscimo irreversível da motilidade espermática, além de mudanças bioquímicas e funcionais nos espermatozoides, devido a um rearranjo de alguns fosfolipídios da membrana plasmática, alterando suas propriedades biológicas básicas, como permeabilidade seletiva e difusão lateral de proteínas [40].

5.CONCLUSÃO

Baixas concentrações de ozônio (5 e 15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) no sêmen equino refrigerado promove proteção ao espermatozoide melhorando os parâmetros cinéticos de motilidade total e progressiva, e aumentando a integridade de membrana plasmática e acrossomal. Concentrações mais altas (30 e 60 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) demonstram ser deletérias ao espermatozoide.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), e a Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

REFERÊNCIAS

- [1] Brinsko SP, Blanchard TI, Varner DD, Schumacher J, Love CC, Hinrichs K, Hartman D. 2011. Manual of Equine Reproduction, 3. ed. MOSBY Elsevier, cap.12, p.160-175.
- [2] Battut IB, Kempfer A, Becker J, Lebailly I, Camugli S. Development of a new fertility prediction model for stallion semen, including flow cytometry. *Theriogenology* 2016; 86: 1111-1131. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.001>
- [3] Olaciregui M, Gil L, Montón A, Luña V, Verez RA, Mari JL. Cryopreservation of epididymal stallion sperm. *Cryobiology* 2014; 68 (1):91-95. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2013.12.009>
- [4] Aitken JR, Lambourne S, Gibb Z. The John Hughes Memorial Lecture: Aspects of Sperm Physiology Oxidative Stress and the Functionality of Stallion Spermatozoa. *J. Equine Vet. Sci.* 2014; 34: 17–27. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2013.10.120>
- [5] 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. *Reprod Dom Anim* 2015; 50 (4): 529–537. <https://doi.org/10.1111/rda.12551>
- [6] Ghallab SM, Shahat AM, Fadl MA, Ayoub MM, Moawad AR. Impact of supplementation of semen extender with antioxidants on the quality of chilled or cryopreserved Arabian stallion spermatozoa. *Cryobiology* 2017; 79:14-20. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.10.001>
- [7] Ashrafi I, Kohram H, Ardabili FF. Antioxidant effects of melatonin on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved bull sperm. *Anim Reprod Sci* 2013; 139: 25 – 30. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.03.016>
- [8] Longobardi, V, Salzano, A, Campanile, G, Marrone, R, Palumbo, F, Vitiello, M, Zullo, G, Gasparrini, B. Carnitine supplementation decreases capacitation-like changes of frozen-thawed buffalo spermatozoa. *Theriogenology* 2017;88:236-243. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.031>

- [9] Nogueira, BG, Sampaio, BFB, Souza, MIL, Costa e Silva EV Zúccari, CESN. Coenzyme Q10 and α -Tocopherol prevent the lipid peroxidation of cooled equine semen. *Reprod Dom Anim* 2015; 50:1003-1010. <https://doi.org/10.1111/rda.12627>
- [10] Lopes de Jesus CC, Dos Santos FC, de Jesus LMOB, Monteiro I, Sant'Ana MSSC, Trevisani VFM. Comparison between intra-articular ozone and placebo in the treatment of knee osteoarthritis: A randomized, double-blinded, placebo-controlled study. *PLOS* 2017;12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179185>
- [11] Aslaner A, Çakır T, Tekeli S, Avcı S, Doğan U, Tekeli F, Soyulu H, Akyüz C, Koç S, Üstünel I. Medical ozone treatment ameliorates the acute distal colitis in rat. *Acta Cir. Bras* 2016; 31: 256–263. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-865020160040000006>
- [12] Hernández Rosales, F.A.; Calunga Fernández, J.L.; Turrent Figueras, J.; Menéndez Cepero, S.; Montenegro Perdomo, A. Ozone therapy e effects on biomarkers and lung function in asthma. *Arch. Med. Res* 2005; 6:549–554. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.04.021>
- [13] Santana-Rodríguez N, Llontop P, Clavo B, Fiuza-Pérez MD, Zerecero K, Ayub A, et al. Ozone Therapy Protects Against Rejection in a Lung Transplantation Model: A New Treatment? *Ann. Thorac. Surg* 2017; 104: 458–464. <https://doi.org/10.1016/j.athoracsur.2017.02.054>
- [14] Izadi, M.; Bozorgi, M.; Hosseine, M.S.; Khalili, N.; Jonaidi-Jafari, N. Health-related quality of life in patients with chronic wounds before and after treatment with medical ozone. *Medicine (Baltimore)* 2018; 97: e12505. <https://doi.org/10.1097 / MD.00000000000012505>
- [15] Sancak EB, Türkön H, Çukur S, Erimsah S, Akbas A, Gulpinar MT, et al. Major Ozonated Auto hemotherapy Preconditioning Ameliorates Kidney Ischemia-Reperfusion Injury. *Inflammation* 2016; 39: 209–217. <https://doi.org/10.1007 / s10753-015-0240-z>
- [16] Sweet F, Kao MS, Lee SC, Hagar WL, Sweet WE. Ozone selectively inhibits growth of human cancer cells. *Science* 1980; 209: 931–933. <https://doi.org/10.1126 / science.7403859>
- [17] Luongo M, Brigida AL, Mascolo L, Gaudino G. Possible Therapeutic Effects of Ozone Mixture on Hypoxia in Tumor Development. *Anticancer Res* 2017; 37: 425–435. <https://doi.org/10.21873 / anticancer.11334>
- [18] Wells KH, Latino J, Gavalchin J, Poiesz BJ. Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 by ozone in vitro. *Blood* 1991; 78: 1882–1890. <https://doi.org/10.1182/blood.V78.7.1882.1882>
- [19] Song, M.; Zeng, Q.; Xiang, Y.; Gao, L.; Huang, J.; Wu, K.; Lu, J. The antibacterial effect of topical ozone on the treatment of MRSA skin infection. *Mol. Med. Rep* 2018;17: 2449–2455. <https://doi.org/10.3892 / mmr.2017.8148>
- [20] Al-Omiri, MK, Abul Hassan RS, Alzarea BK, Lynch E. Comparison of dental bleaching effects of ozone and hydrogen peroxide: An ex vivo study. *Am. J. Dent* 2016;29: 251–254. PMID: 29178736
- [21] Isler SC, Unsal, B, Soysal F, Ozcan G, Peker E, Karaca IR. The effects of ozone therapy as an adjunct to the surgical treatment of peri-implantitis. *J. Periodontal. Implant. Sci* 2018; 48:136–151. <https://doi.org/10.5051 / jpis.2018.48.3.136>

- [22] Srikanth, A.; Sathish, M.; Sri Harsha, A.V. Application of ozone in the treatment of periodontal disease. *J. Pharm. Bioallied. Sci* 2013; 5:S89–S94. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.113304>
- [23] Bocci V, Zanardi L, Travaglini V. Oxygen/ozone as a medical gas mixture. A critical evaluation of the various methods clarifies positive and negative aspects. *Medical Gas Research* 2011; 1:1-6. <https://doi.org/10.1186/2045-9912-1-6>
- [24] Hartwig FP, Lisboa FP, Hartwig FP, Monteiro GA, Maziero RRD, Freitas-dell'aqua CP, et al. Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: An alternative for bad cooler stallions. *Theriogenology* 2014; 81(2): 340–346. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.10.003>
- [25] Freitas-dell'aqua CP, Guasti PN, Monteiro GA, Maziero RRD, Dell'aqua jr JA, Papa FO. Flow cytometric analysis of fertile and subfertile frozen stallion spermatozoa. *Animal Reproduction* 2012; 9:941.
- [26] Camargo LS, Freitas-Dell'aqua CP, Schmit R, Guasti PN, Volpato MAS, Souza FF. New multicolor protocol to assessment dog spermatozoa by flow cytometer. Poster abstracts. VI International Symposium on Animal Biology of Reproduction, 2016, Campos do Jordão, SP, Brazil.
- [27] Guasti PN, Freitas-dell'aqua CP, Maziero RRD, Monteiro GA, Hartwig FP, Lisboa FP, Papa PM, Papa FO. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide from subfertile stallion spermatozoa during storage at refrigeration temperature. In: 39th Annual Conference of the IETS, 2012, Hannover. *Reproduction, Fertility and Development* 2012;25:20.
- [28] Bocci V, Valacchi G, Nrf2 activation as target to implement therapeutic treatments. *Front Chem* 2015; 3: 4. <https://doi.org/10.3389/fchem.2015.00004>
- [29] Galiè M, Covi V, Tabaracci G, Malatesta M. The Role of Nrf2 in the Antioxidant Cellular Response to Medical Ozone Exposure. *International Journal of Molecular Sciences* 2019; 20: 4009. <https://doi.org/10.3390/ijms20164009>.
- [30] Galiè M, Costanzo M, Nodari A, Boschi F, Calderan L, Mannucci S, Covi V, Tabaracci G, Malatesta M. Mild ozonisation activates antioxidant cell response by the Keap1/Nrf2 dependent pathway. *Free Radical Biology and Medicine* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.093>.
- [31] Meng W, Xu Y, Li D, Zhu E, Deng L, Liu Z, et al. Ozone protects rat heart against ischemia-reperfusion injury: A role for oxidative preconditioning in attenuating mitochondrial injury. *Biomed. Pharm* 2017; 8:1090–1097. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.01.151>
- [32] Holmström KM, Baird L, Zhang Y, Hargreaves I, Chalasani A, Land JM, Stanyer L, Yamamoto M, Dinkova-Kostova AT, Abramov AY. Nrf2 impacts cellular bioenergetics by controlling substrate availability for mitochondrial respiration. *Biol. Open* 2013; 2: 761–770. <https://doi.org/10.1242/bio.20134853>
- [33] Chen K, Mai Z, Gao X, Yu B. Low NRF2 mRNA expression in spermatozoa from men with low sperm motility. *Tohoku J Exp Med* 2012; 228 (3): 259-66. <https://doi.org/10.1620/tjem.228.259>
- [34] Hezavehei M, Kouchesfahani HM, Sharafi M, Salekdh H, Eftekhari-Yazdi P. Preconditioning of sperm with sublethal nitrosative stress: a novel approach to

improved frozen–thawed sperm function. *RBMO* 2019; 36: 413-425. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.11.029>

[35] 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* 2015;9:230-237. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.06.008>

[36] Inal M, Dokumacioglu UM, Özcelik E, Ucar ó. The effects of ozone therapy and coenzyme Q₁₀ combination of markers of oxidative stress in healthy individuals. *Ir J Med Sci* 2011;180: 703-707. <https://doi.org/10.1007 / s11845-011-0675-7>.

[37] Salem EA, Salem NA, Hellstrom WJ. Therapeutic effect of ozone and rutin on adriamycin induced testicular toxicity in an experimental rat model. *Andrologia* 2016; <https://doi.org/10.1111/and.12603>.

[38] Kankofer M, Kolm G, Aurich J, Aurich C. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5 °C. *Theriogenology* 2005; 63:1354–1365. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.07.005>.

[39] Flesch FM, Gadella BM. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1469:197-235. [https://doi.org/10.1016/S0304-4157\(00\)00018-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4157(00)00018-6).

[40] Amann RP, Pickett BW. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science* 1987;7:145–173. [https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(87\)80025-4](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(87)80025-4).

NORMAS DA REVISTA

Revista: THERIOGENOLOGY – ANIMAL REPRODUCTION

<https://www.elsevier.com/journals/theriogenology/0093-691x/guide-for-authors>

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
fone (67) 3345-7925