

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

CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN EQUINO REFRIGERADO  
POR 72 HORAS COM ANTIOXIDANTES NÃO  
ENZIMÁTICOS

Bruno Gomes Nogueira

CAMPO GRANDE, MS  
2015

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

**CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN EQUINO REFRIGERADO  
POR 72 HORAS COM ANTIOXIDANTES NÃO  
ENZIMÁTICOS**

Characteristics of equine semen chilled for 72 hours with non-enzymatic  
antioxidants

**Bruno Gomes Nogueira**

**Orientador: Profa. Dra. Carmem Estefânia Serra Neto Zúccari**

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  
2015

Certificado de aprovação

**BRUNO GOMES NOGUEIRA**

**Características do sêmen equino refrigerado por 72 horas com antioxidantes não enzimáticos**

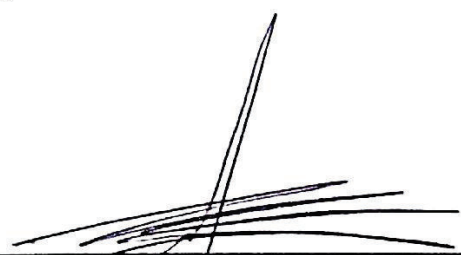
**Characteristics of equine semen chilled for 72 hours with non-enzymatic antioxidants**

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.

Aprovado(a) em: 27/02/2015

BANCA EXAMINADORA:



---

Prof. Dra. Carmem Estefânia Serra Neto Zúccari  
(UFMS) – (Orientadora)



---

Dr. Jose Robson Bezerra Sereno  
EMBRAPA Cerrados



---

Prof. Dra. Maria Inês Lenz Souza  
UFMS

*Dedico aos meus pais, João e Célia, ao meu irmão, Bernardo, a minha amada esposa Julia, que sempre me apoiaram e incentivaram, ajudando-me a superar todas as adversidades e a buscar os meus sonhos, sendo fundamentais em todos os momentos da minha vida.*

*Ao meu pequeno Breno, que em breve estará conosco, mas que já me traz muita felicidade e força para seguir em frente.*

*Amo muito vocês!!!!*

*Não poderia deixar de dedicar este trabalho à minha orientadora e amiga Fana, que através dos seus ensinamentos, sabedoria e paciência, tornou possível este sonho, não só contribuindo para o meu crescimento profissional, mas também para minha evolução como ser humano.*

*Meus sinceros, profundos e eternos  
agradecimentos!!!*

## **AGRADECIMENTOS**

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

A Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

À minha orientadora Profa. Dra. Carmem Estefânia Serra Neto Zúccari, por todo ensinamento transmitido, pelas longas horas de conversa, pelas críticas construtivas, pelos incentivos e pela amizade construída ao longo destes anos.

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

À Profa. Dra. Maria Inês Lenz Souza, pela amizade, apoio, participações nas bancas, correções e sugestões.

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

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

Ao amigo e doutorando Breno Fernandes Barreto Sampaio, pelo companheirismo e por toda ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Às graduandas em Medicina Veterinária, Maria Gabriela Barrueco, Laura Tiemann e Natália Dias, pela ajuda no desenvolvimento da parte prática do experimento.

Aos colegas, Médicos Veterinários, Daniela Brandão, Marco Tulio, Rodrigo (Magrão), Cintia e Gustavo, pela ajuda prestada na parte prática do experimento.

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

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

Aos meus tios, “Mama” e “Caqui”, e primos, Fred e Rodrigo, por todo incentivo e amor prestados ao longo da minha vida.

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

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

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

Ao Senhor Marcelo e Senhora Perpétua Wanderley, Ana Flávia, Thadeu Rodrigues e família, e toda equipe do Haras Nanuque, por confiarem no meu trabalho e me apoiarem na conquista deste sonho. Agradeço também, por gentilmente colocarem os animais do haras à disposição da pesquisa.

Você não sabe o quanto eu caminhei  
Pra chegar até aqui  
Percorri milhas e milhas antes de dormir  
Eu não cochilei  
Os mais belos montes escalei  
Nas noites escuras de frio chorei  
A vida ensina e o tempo traz o tom  
Pra nascer uma canção  
Com a fé no dia-a-dia  
Encontro a solução  
Encontro a solução...  
(A Estrada – Cidade Negra)

## Resumo

NOGUEIRA, B.G. Características do sêmen equino refrigerado por 72 horas com antioxidantes não enzimáticos. 2015. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2015.

Os radicais livres oriundos do metabolismo do oxigênio são denominados de espécies reativas de oxigênio (ROS). Em concentrações fisiológicas estes metabólitos exercem um papel fundamental na regulação da atividade funcional do espermatozoide. A homeostase intracelular é mantida através de um sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático. No entanto, quando ocorre a produção excessiva de ROS e/ou uma deficiência no sistema de defesa celular, é gerado um quadro de estresse oxidativo. Como consequência, inicia-se um processo de peroxidação dos ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) presentes na membrana celular, denominado de peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO). A membrana plasmática do espermatozoide de mamíferos é formada por altas concentrações de PUFAs, fato que a torna suscetível ao processo de LPO, levando a danos irreversíveis, podendo resultar em infertilidade. A refrigeração do sêmen equino é uma biotecnologia que permite seu armazenamento por dias, antes de sua utilização na inseminação artificial, proporcionando assim, inúmeras vantagens para a equideocultura. Contudo, as técnicas aplicadas ao sêmen equino promovem um aumento das ROS e redução da defesa antioxidante natural, tanto pela diluição como eliminação do plasma seminal. Desta forma, objetivou-se avaliar o efeito da adição de Coenzima Q10 (CoQ10) e  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -TOH), isoladamente e em associação, sobre as variáveis espermáticas, e a eficácia dos mesmos na prevenção da LPO do sêmen equino, durante refrigeração a 5°C por 72 horas. Foram utilizados dez garanhões adultos de fertilidade comprovada, obtendo-se dois ejaculados por reprodutor, submetendo-os aos seguintes tratamentos: C=controle (sem adição de antioxidantes); EtOH=controle positivo etanol (100  $\mu$ L etanol);  $\alpha$ -TOH=2 mM; CoQ10=40  $\mu$ g/mL e CoQ10+ $\alpha$ -TOH=40  $\mu$ g/mL+2 mM. O grupo da CoQ10 apresentou maior percentual de espermatozoides móveis ( $69,1 \pm 16,2\%$ ) quando comparado ao controle ( $62,1 \pm 16,2\%$ ) e EtOH ( $58,1 \pm 18,6\%$ ), bem como o vigor, com escores superiores aos demais tratamentos ( $p < 0,05$ ). Os grupos CoQ10+ $\alpha$ -TOH e  $\alpha$ -TOH foram os mais eficazes na prevenção da LPO em comparação ao controle ( $1.765,9 \pm 695,9$ ;  $1.890,8 \pm 749,5$ ;  $2.506,2 \pm 769,4$  ng MDA/ $10^8$  spz, respectivamente). Conclui-se que a CoQ10 e o  $\alpha$ -TOH foram eficazes, durante a refrigeração

do sêmen equino a 5°C por 72 horas, em proporcionar maiores valores de motilidade total e vigor espermáticos, bem como menor LPO. Portanto, mais estudos são necessários para se determinar as doses e protocolos mais indicados, em especial frente à suscetibilidade individual e a variação entre ejaculados.

Palavras-chave:  $\alpha$ -tocoferol, Coenzima Q10, Peroxidação Lipídica, Refrigeração, ROS

## Abstract

NOGUEIRA, B.G. Characteristics of equine semen chilled for 72 hours with non-enzymatic antioxidants. 2015. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2015.

Free radicals derived from oxygen metabolism are called reactive oxygen species (ROS). In physiological concentrations these metabolites play a key role in regulating the functional activity of sperm. The intra cellular homeostasis is maintained through an enzymatic and non-enzymatic antioxidant cellular system defense. However, when there is an excessive generation of ROS and/or a deficiency in the cellular defense system, a framework of oxidative stress is established. As a result, a process of peroxidation of membranes polyunsaturated fatty acids (PUFAs) is started. This process is called lipid peroxidation (LPO). The plasma membrane of mammalian sperm is formed by high concentrations of PUFAs, a fact that makes it susceptible to LPO process, leading to irreversible cell damage, and may even result in infertility. Cooling process of equine semen is a biotechnology that allows storage for days, before their use in artificial insemination, thus providing numerous advantages for horse industry. However, biotechnology applied for equine semen promotes an increasing on ROS levels production and reduction of the natural antioxidant defense, by both dilution and removal of seminal plasma. So, the aim of this study were to evaluate the effect of adding Coenzyme Q10 (CoQ10) and  $\alpha$ -tocopherol ( $\alpha$ -TOH), singly and in combination, on sperm parameters, and their effectiveness in preventing LPO of equine semen during cooling at 5°C for 72 hours. Ten adult stallions of proven fertility were used, using two ejaculates each, subjecting them to the following treatments: C=control (without addition of antioxidants); EtOH= positive control (100  $\mu$ L ethanol);  $\alpha$ -TOH=2 mM; CoQ10=40  $\mu$ g/mL and CoQ10+ $\alpha$ -TOH= 40  $\mu$ g/mL+2 mM. The CoQ10 group had a higher percentage of mobile spermatozoa ( $69.1 \pm 16.2\%$ ) compared to control ( $62.1 \pm 16.2\%$ ) and EtOH ( $58.1 \pm 18.6\%$ ), as well as sperm vigor with scores higher than the other treatments ( $p < 0.05$ ). CoQ10+ $\alpha$ -TOH and  $\alpha$ -TOH groups were most effective in preventing LPO compared to controls ( $1,765.9 \pm 695.9$ ,  $1890.8 \pm 749.5$ ,  $2506.2 \pm 769.4$  ng MDA/ $10^8$  spz, respectively). In conclusion, CoQ10 and  $\alpha$ -TOH were effective during cooling process of equine semen at 5 ° C for 72 hours, providing increased levels of total motility and sperm vigor, as well as lower levels of LPO. Therefore, further studies are required to determine the most suitable doses and

protocols, in particular against the individual susceptibility and the variation between ejaculates.

Keywords:  $\alpha$ -tocopherol, Coenzyme Q10, Cooled semen, Lipid Peroxidation, ROS

## **Lista de ilustrações**

|                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - Compartimentalização sub-celular da fosforilação oxidativa (OXPHOS) e glicólise no espermatozoide..... | 11 |
| Figura 2 - Redução tetravalente do oxigênio molecular que ocorre na mitocôndria.....                              | 12 |

## Lista de tabelas

|                                                                                                                                                                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 - Valores médios ( $\pm$ desvio padrão) das variáveis espermáticas durante a refrigeração a 5°C do sêmen equino acrescido de CoQ10, $\alpha$ -tocoferol e etanol.....                                | 40 |
| Tabela 2 - Valores médios ( $\pm$ desvio padrão) das variáveis espermáticas durante refrigeração por 72 horas a 5°C do sêmen equino incubado com antioxidantes não enzimáticos isolados ou em associação..... | 42 |

## SUMÁRIO

|                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 INTRODUÇÃO.....                                                              | 1  |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA.....                                                   | 1  |
| 2.1 Refrigeração do Sêmen Equino.....                                          | 2  |
| 2.1.1 Efeito da refrigeração sobre as características seminais de equinos..... | 5  |
| 2.1.2 Técnicas associadas à refrigeração do sêmen equino.....                  | 6  |
| 2.2 Metabolismo Espermático.....                                               | 9  |
| 2.3 Radicais Livres.....                                                       | 10 |
| 2.4 Espécies Reativas de Oxigênio.....                                         | 11 |
| 2.4.1 Ânion superóxido.....                                                    | 12 |
| 2.4.2 Peróxido de hidrogênio.....                                              | 12 |
| 2.4.3 Radical hidroxila.....                                                   | 13 |
| 2.5 Função Espermática vs Espécies Reativas de Oxigênio.....                   | 13 |
| 2.6 Peroxidação Lipídica.....                                                  | 15 |
| 2.7 Sistema de Defesa Antioxidante.....                                        | 16 |
| 2.7.1 Antioxidantes não enzimáticos.....                                       | 17 |
| 2.7.1.1 Vitamina E.....                                                        | 17 |
| 2.7.1.2 Coenzima Q10.....                                                      | 19 |
| 2.8 Considerações Finais.....                                                  | 21 |
| 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                                              | 22 |
| 4 EXPERIMENTO (ARTIGO CIENTÍFICO).....                                         | 34 |
| Introdução.....                                                                | 35 |
| Materiais e Métodos.....                                                       | 36 |
| Resultados.....                                                                | 40 |
| Discussão.....                                                                 | 43 |
| Agradecimentos.....                                                            | 48 |
| Referências Bibliográficas.....                                                | 48 |

## 1 INTRODUÇÃO

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

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

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

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

Com o avanço das biotecnologias da reprodução, busca-se, cada vez mais, a melhoria da qualidade dos processos de conservação do material genético com vistas a aumentar a eficiência das biotécnicas reprodutivas. Assim, diversos estudos vêm acrescentando antioxidantes aos meios diluidores na tentativa de neutralizar os efeitos nocivos das ROS (Yousefian et al., 2014), uma vez que a manipulação, o armazenamento, a refrigeração e a congelamento do sêmen resultam em aumento dos níveis de ROS (Aurich et al., 2007).

A presente revisão tem por objetivo abordar aspectos relacionados à refrigeração do sêmen equino, os mecanismos envolvidos na produção de ROS, seus efeitos deletérios e

benéficos ao sêmen de mamíferos, assim como os mecanismos antioxidantes de defesa celular envolvidos no processo.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Refrigeração do Sêmen Equino**

A refrigeração do sêmen equino é uma biotecnologia da reprodução que permite o seu armazenamento por horas ou mesmo dias, antes da sua utilização para a inseminação artificial (IA), sem que haja redução significativa na taxa de prenhez (Brinsko et al., 2011). Desta forma, torna-se possível o transporte de doses de sêmen a serem utilizadas em éguas alojadas à distância do garanhão, reduzindo custos e riscos referentes ao transporte de animais e proporcionando o maior uso de garanhões geneticamente superiores, assim, contribuindo para o melhoramento genético dos plantéis (Graham, 2011).

A refrigeração provoca estresse aos espermatozoides, podendo ser deletéria à célula, portanto, algumas precauções devem ser tomadas (Graham, 2011). Tais medidas envolvem a composição do diluente e taxa de diluição, curva de refrigeração e temperatura final de armazenamento, tempo total de estocagem, contêiner utilizado e suscetibilidade individual do garanhão (Province et al., 1985; Varner et al., 1988; Kayser et al., 1992; Squires et al., 1999; Brinsko et al., 2000a; Farrás et al., 2008).

Os diluidores comerciais normalmente são formulados com leite desnatado acrescido de glicose e antibióticos, ou à base de gema de ovo. A diluição do sêmen equino proporciona diversas vantagens; dentre elas destacam-se o oferecimento de um meio rico em nutrientes, proteção contra condições desfavoráveis como mudanças de temperatura, tratamento com antibióticos que diminuem a probabilidade de transmissão de patógenos, neutralização de produtos tóxicos produzidos pelo espermatozoide e a adição de substâncias que possam atuar na estabilização e preservação da integridade da membrana plasmática (Squires et al., 1999; Brinsko et al., 2011). Varner et al. (1988) relatam que o leite desnatado, utilizado no diluidor do sêmen, é rico em fosfolipídeos, os quais teriam a finalidade de promover modificações estruturais na membrana celular, desta forma permitindo a adaptação espermática às baixas temperaturas. Pugliesi (2009) constatou que o diluente composto por glicina-gema de ovo, não é eficaz em preservar

as características seminais de equinos, quando da refrigeração por 24 horas a 5°C, resultando em baixo índice de fertilidade.

A taxa de diluição do sêmen submetido à refrigeração é de extrema importância para a preservação celular, uma vez que tem a finalidade de suprir energeticamente e proteger o espermatozoide ao longo da refrigeração (Aurich, 2005). Normalmente, em inseminações a fresco, a diluição do sêmen é feita na proporção de 1:1 (diluidor:sêmen); porém, na refrigeração, esta proporção deve ser de no mínimo 2:1, dependendo da concentração do ejaculado do garanhão. Varner et al. (1987) demonstraram uma maior eficácia quando o sêmen foi diluído a 25 milhões de espermatozoides/mL, quando comparado à 50 e 100 milhões de espermatozoides/mL; além disso, concentrações abaixo de 25 milhões de espermatozoides/mL resultaram em menor motilidade e fertilidade. A concentração final da amostra refrigerada deve ficar próxima dos 25 milhões de espermatozoides/mL (Squires et al., 1999), ou, segundo Aurich (2008), entre 25 a 50 milhões de espermatozoides/mL, pois uma grande concentração de plasma seminal tem-se mostrado deletéria para a célula espermática (Jasko et al., 1991).

Em relação à taxa de refrigeração, Kayser et al. (1992) relataram que o sêmen equino pode ser refrigerado rapidamente de 37 a 20°C mas, entre 20 a 5°C, deve-se obedecer à uma curva lenta de refrigeração, menor que -0,1°C/min. De fato, nesta faixa de temperatura ocorre a transição de fase dos lipídeos da membrana plasmática, que passam do estado líquido-cristalino para gel (Squires et al., 1999), e uma curva de refrigeração lenta neste período pode reduzir os danos causados à membrana plasmática, relacionados ao choque térmico pelo frio. Squires et al. (1999) indicam que esta fase crítica ocorre entre 19 e 8°C, momento em que a taxa de refrigeração deve ser de -0,05°C/min., desta forma, favorecendo a reorganização dos lipídeos da membrana plasmática. Taxas de refrigeração rápidas, superiores a -1,0°C/min., bem como muito lentas, menores que -0,05°C/min., causam redução da motilidade e aumento das alterações ou defeitos espermáticos (Douglas-Hamilton et al., 1984). Province et al. (1985) compararam a imersão direta do sêmen em água a 5°C e taxas de refrigeração de -1,0, -0,5 e -0,2°C/min., sendo observada redução significativa da motilidade espermática quando o sêmen foi submetido diretamente a 5°C. Taxas de refrigeração lenta (-0,3°C/min.), média (-0,9°C/min.) e rápida (-1,3°C/min.) foram avaliadas por

Varner et al. (1988), sendo observados os melhores valores de motilidade total e progressiva, quando a taxa lenta de refrigeração foi utilizada.

Quanto a temperatura final de armazenamento, Province et al. (1985) avaliaram a refrigeração do sêmen equino a 5, 10, 15 e 20°C, e verificaram maior percentual de motilidade espermática quando o sêmen foi resfriado, por até 36 horas, a 15 e a 20°C quando comparado com 5 e 10°C. Resultados semelhantes foram encontrados por Batellier et al. (2001), que observaram maiores longevidade espermática e taxa de gestação com a refrigeração do sêmen a 15°C por 24 horas, do que a 5°C pelo mesmo período. No entanto, Varner et al. (1988) e Kayser et al. (1992) obtiveram valores superiores para motilidade espermática, utilizando a temperatura de 4 e 5°C para o armazenamento do sêmen equino por 24 horas, quando comparado à temperatura de 20 e 25°C. Squires et al. (1999) afirmam que o armazenamento entre 4 e 5°C é mais efetivo para a manutenção da viabilidade das células espermáticas do que em temperaturas mais baixas, entre 0 e 2°C. Segundo Aurich (2008), para o sêmen de garanhões, a temperatura de 5°C foi estabelecida como a ideal para a manutenção da motilidade e fertilidade.

O tempo total de armazenamento é de grande importância para a logística de transporte das doses de sêmen comercializadas. O armazenamento por longos períodos pode desencadear processos bioquímicos como a LPO, podendo comprometer a fertilidade do espermatozoide (Graham, 2011). Relatos indicam que a capacidade fecundante do espermatozoide pode ser mantida a 4°C por 24 a 48 horas de armazenamento (Batellier et al., 2001; Newcombe e Cuervo-Arango, 2011).

Existem sistemas de refrigeração passiva e ativa. O sistema de refrigeração passiva foi desenvolvido na forma de contêineres de custo acessível e capazes de proporcionar uma taxa de refrigeração inicial de aproximadamente -0,3°C/min. (Nunes et al., 2006); porém a taxa de refrigeração pode ser influenciada por fatores externos como a temperatura ambiente, além do volume e temperatura inicial da amostra (Valle et al., 1999). Os sistemas de refrigeração ativa possuem taxas de refrigeração pré-determinadas, porém têm alto custo e por isso seu uso a campo torna-se limitado.

Dentre os sistemas de refrigeração passiva destacam-se o Equitainer<sup>®</sup> e o Botutainer<sup>®</sup>. O primeiro é o mais conhecido em âmbito internacional e foi desenvolvido por Douglas-Hamilton et al. (1984). Este sistema possui uma taxa de refrigeração inicial de -0,3°C/min, atingindo a temperatura final de 5°C em 10 horas, sendo capaz de mantê-

la por até 70 horas. Segundo Brinsko et al. (2000a), seu alto custo de aquisição e necessidade de retorno ao haras ou central de origem, dificultam sua utilização. Desta forma, modelos de refrigeração passiva com baixo custo de produção foram desenvolvidos (Nunes et al., 2008). Atualmente, os contêineres de refrigeração passiva utilizados a campo são o Max-Sêmen Express<sup>®</sup>, no qual o sêmen é mantido a aproximadamente 15°C por 24 horas e o Botu-Flex<sup>®</sup>, em que de acordo com o fabricante, o sêmen pode ser armazenado por 24 horas a 15°C com a utilização de uma bombona de gelo reciclável, ou por 48 horas a 5°C com a utilização de duas bombonas de gelo reciclável (Papa et al., 2011).

Os equinos, diferindo das demais espécies de animais de produção, não são selecionados para fertilidade, e sim por seu desempenho atlético, linhagem e conformação, implicando em grande variabilidade entre indivíduos quanto à fertilidade (Aitken et al., 2014). Devido à falta de seleção genética para as características reprodutivas, nem todos os garanhões apresentam sêmen com níveis satisfatórios de fertilidade, seja *in natura* ou pós-processamento laboratorial. Desta forma, garanhões são classificados como “bons ou maus refrigeradores”, de acordo com a suscetibilidade individual (Brinsko et al., 2000b). Tal diferença vem sendo atribuída à composição do plasma seminal e à proporção de colesterol presente na membrana plasmática (Aurich, 2005).

### **2.1.1 Efeito da refrigeração sobre as características seminais de equinos**

A queda da temperatura do sêmen durante a refrigeração resulta em diminuição do metabolismo espermático. A cada 10°C de redução na temperatura, o metabolismo é diminuído em 50%. Quando os espermatozoides são mantidos a 5°C, apenas 10% de seu metabolismo são necessários para sua sobrevivência, possibilitando a preservação do ejaculado por longos períodos (Squires et al., 1999). Um passo crítico é a mudança de 18°C para 8°C, pois nesta condição o espermatozoide fica mais suscetível ao choque térmico pelo frio, podendo resultar em lesões na membrana plasmática (Pickett e Amann, 1987).

A membrana plasmática do espermatozoide equino é composta por proteínas e carboidratos, além da bicamada lipídica rica em ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs; Amann e Graham, 2011). De acordo com Squires et al. (1999), o estresse térmico pode resultar em lesões diretas, como a ruptura da membrana, ou indiretas, por alteração da

função celular. Modificações na organização em mosaico fluido da membrana, tais como assimetrias na bicamada lipídica, podem provocar alterações nos receptores de membrana, resultando em disfunção celular (Nunes et al., 2006), comprometendo a capacidade fecundante dos espermatozoides (Amann e Graham, 2011).

Segundo Varner et al. (1988), a queda da motilidade espermática associada ao estresse térmico pelo frio é secundária aos efeitos deletérios ocasionados na membrana plasmática. Além disso, a motilidade é dependente da produção de energia que é gerada na bainha mitocondrial, portanto a queda da motilidade observada durante a refrigeração do sêmen equino pode ser ocasionada inclusive por disfunção mitocondrial (Aurich, 2005).

As principais consequências do choque térmico pelo frio são caracterizadas por padrões anormais de motilidade, como o movimento circular fechado, uma rápida perda de motilidade durante o armazenamento, danos às membranas plasmática e acrossomais, assim como um metabolismo reduzido, devido à perda de enzimas e outros componentes celulares (Pickett e Amann, 1987).

Outro aspecto de grande relevância, que influencia diretamente as características seminais durante a refrigeração do sêmen equino, envolve a produção fisiológica e patológica das ROS, a qual é aumentada durante a manipulação, refrigeração e armazenamento do sêmen (Aurich et al., 1997), podendo culminar na peroxidação dos lipídeos da membrana plasmática, que afeta tanto sua integridade, como a motilidade e a integridade da cromatina, desta forma, comprometendo a fertilidade (Aitken, 1995; Graham, 2011).

López-Fernández et al. (2007) sugerem que a refrigeração do sêmen equino possa induzir à apoptose espermática através do estresse oxidativo, o que levaria, subsequentemente, à fragmentação da cromatina e redução do potencial fecundante.

Avaliando doses de sêmen de garanhões refrigeradas a serem utilizadas para IA, Johannisson et al. (2014) observaram que amostras com baixos níveis de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) possuíam maior percentual de cromatina íntegra e de motilidade progressiva, além de proporcionarem maior taxa de gestação, quando comparadas às amostras com elevados níveis dessa ROS, sugerindo que as ROS possam ser um dos fatores relacionados com a redução da fertilidade do sêmen armazenado sob a refrigeração.

### 2.1.2 Técnicas associadas à refrigeração do sêmen equino

A suscetibilidade individual do garanhão à refrigeração é apontada como uma das principais causas que afeta a longevidade do espermatozoide (Aurich, 2008). Assim, a utilização de estratégias metodológicas à seleção e ao processamento do sêmen de baixa qualidade, maximiza o potencial reprodutivo do garanhão (Loomis, 2006). Dentre as metodologias adotadas destacam-se a remoção do plasma seminal (Jasko et al., 1991; Brinsko et al., 2000b; Barrier-Battut et al., 2013) e a adição de antioxidantes *in vitro* (Almeida e Ball, 2005; Franco et al., 2013; Yousefian et al., 2014).

O plasma seminal é constituído pelas secreções do epidídimo e das glândulas acessórias, sendo liberado durante a ejaculação, que no caso do garanhão ocorre com a emissão de cinco a oito jatos de sêmen, decorrentes de contrações uretrais (Aurich, 2005; Kareskoski et al., 2011). Diferenças bioquímicas são encontradas na composição do plasma seminal das frações do ejaculado, bem como na concentração de células, onde cerca de 70% dos espermatozoides estão presentes nos primeiros três jatos (Varner et al., 1987; Kareskoski et al., 2011).

A composição do plasma seminal varia entre indivíduos e entre ejaculados do mesmo animal (Kareskoski e Katila, 2008). São constituintes básicos do plasma seminal os compostos orgânicos e inorgânicos, tais como, aminoácidos, proteínas, íons, frutose, ocitocina, ergotioneína, glicerilfosforilcolina, ácido cítrico, enzimas e antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Troedsson et al., 2005; Kareskoski e Katila, 2008; Guasti et al., 2012).

Dentre as funções do plasma seminal destacam-se a maturação espermática pós-testicular, sua ação antimicrobiana, neutralização de catabólitos e atividade regulatória sobre a capacitação espermática. No trato feminino, através das prostaglandinas  $\text{PGF}_2\alpha$  e  $\text{PGE}$ , ocitocina e estrógenos, o plasma seminal participa do transporte e eliminação de espermatozoides mortos ou excedentes, além de modular a resposta inflamatória uterina pós-cobertura (Troedsson et al., 2005; Topfer-Petersen et al., 2005; Guasti et al., 2012).

Segundo Squires et al. (1999), o plasma seminal não é o meio ideal para a preservação dos espermatozoides, principalmente por longos períodos. De fato, grandes concentrações de plasma seminal, assim como sua remoção total mostraram-se deletérias para a manutenção da motilidade e fertilidade do sêmen equino refrigerado

(Jasko et al., 1992). Carver e Ball (2002) relataram que a atividade da enzima lipase pode ser, para alguns gananhões, um dos fatores relacionados aos efeitos prejudiciais do plasma seminal durante a refrigeração do sêmen a 5°C. No entanto, preconiza-se a manutenção de 5 a 20% de plasma seminal pós-centrifugação (Jasko et al., 1992; Loomis, 2006).

A remoção do plasma seminal é recomendada principalmente para gananhões “maus refrigeradores” (Brinsko et al., 2000b). A centrifugação do sêmen é o procedimento adotado, porém deve ser usada com cautela, pois pode ocasionar lesões no espermatozoide. Em geral a força de centrifugação usada varia de 400 a 600 x g, por 10-15 minutos, com o sêmen já diluído na proporção de 1:1. Forças de centrifugação superiores a estas e a ressuspensão vigorosa do *pellet* podem causar danos aos espermatozoides, com subsequente perda de qualidade seminal e lesão celular, respectivamente (Aurich, 2008). Segundo Loomis (2006) esta técnica resulta em perda de 25% dos espermatozoides no sobrenadante.

Avaliando cinco forças de centrifugação e tempos diferentes (600 x g/10 min, e 600, 1.200, 1.800, 2.400 x g/5 min.), sobre as características seminais do sêmen refrigerado, Hoogewijs et al. (2010) constataram 22% de perda de espermatozoides no sobrenadante para 600 x g/10 min., enquanto 1.800 e 2.400 x g/5 min. resultaram em apenas 7,4 e 2,1% de perda, respectivamente ( $p < 0,05$ ). A centrifugação resultou em melhor qualidade seminal pós-refrigeração, sendo a motilidade total menor quando o sêmen foi centrifugado a 600 x g/10 min. Apesar do índice de integridade do DNA ter diminuído ao longo do tempo de armazenamento, não foi observada diferença significativa entre as diferentes forças de centrifugação. Desta forma, os autores concluíram que a perda de espermatozoides no sobrenadante pode ser drasticamente reduzida ao aumentar a força de rotação e diminuir o tempo de centrifugação (1.800 e 2.400 x g/5 min.), sem que haja comprometimento da qualidade seminal *in vitro*, assim, aumentando o número de doses inseminantes por ejaculado.

Barrier-Battut et al. (2013) avaliaram os efeitos da centrifugação com e sem remoção do plasma seminal, sobre as características do sêmen equino submetido à refrigeração a 4°C por 48 horas. Amostras centrifugadas para a remoção do plasma seminal exibiram o maior percentual de membranas íntegras pelo teste hiposmótico

( $p < 0,0001$ ) e uma menor reatividade acrossomal quando incubadas com ionóforo de cálcio (A23187;  $p < 0,0001$ ), após o período de armazenamento.

O plasma seminal contém uma grande gama de enzimas, sendo que a maior parte delas está relacionada ao sistema antioxidante de defesa celular (Troedsson et al., 2005), cuja principal função é proteger os espermatozoides contra os efeitos nocivos do estresse oxidativo (Aurich, 2005). Estão presentes no plasma seminal as enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase, além de antioxidantes não enzimáticos como albumina, taurina, hipotaurina, piruvato, ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol, ergotioneína e coenzima Q10 (Agarwal et al., 2008). Contudo, a composição do plasma seminal exhibe grande variação entre indivíduos e ejaculados (Kareskoski e Katila, 2008), sendo encontradas correlações positivas entre oxidação de lipídeos e proteínas e disfunção espermática em garanhões sub-férteis (Morte et al., 2008). Desta forma, diversos estudos vêm testando a utilização de antioxidantes *in vitro*, com o intuito de prevenir a LPO e preservar as características seminais durante o processamento e armazenamento do sêmen de garanhões (Aurich et al., 1997; Ball et al., 2001; Bruemmert et al., 2002).

Recentemente, a refrigeração do sêmen equino a 5°C por 48 horas, acrescido de antioxidantes não enzimáticos, mostrou-se eficaz ao proporcionar maior percentual de motilidade total, progressiva, integridade de membrana e redução dos níveis de LPO (Yousefian et al., 2014).

## **2.2 Metabolismo Espermático**

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

As mitocôndrias são organelas celulares responsáveis pela produção de ATP e, no espermatozoide, estão localizadas exclusivamente na peça intermediária (Peña et al., 2009). As principais vias metabólicas para a síntese de energia são a glicólise e a fosforilação oxidativa (OXPHOS). Tais vias podem variar quanto a sua importância, bem como sua localização nas diferentes espécies de mamíferos. Enquanto a OXPHOS ocorre exclusivamente na mitocôndria, a glicólise acontece nas fibras externas densas do flagelo, local onde se encontram as enzimas glicolíticas (Ferramosca e Zara, 2014). Sugere-se que o espermatozoide equino seja extremamente dependente da OXPHOS (Varner et al., 2014). Gibb et al. (2014) ratificaram esta informação ao exporem espermatozoides equino e humano à presença de um inibidor mitocondrial (difenil-eneiodônio – DPI). As células da espécie equina tiveram uma redução significativa da velocidade espermática ( $p < 0,01$ ) e dos níveis de ATP ( $p < 0,05$ ), fato não observado na amostra humana.

A OXPHOS ocorre mais precisamente nas cristas da membrana mitocondrial interna, através da cadeia de transporte de elétrons, onde moléculas de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e flavina-adenina dinucleotídeo ( $\text{FADH}_2$ ) oriundas do ciclo de Krebs e da glicólise, doam elétrons para a primeira proteína mitocondrial, denominada de complexo I. Estes elétrons percorrem toda a crista através dos complexos II, III, IV e da coenzima Q (ubiquinona) (Figura 1) e, ao final, estes são transferidos para uma molécula de oxigênio ( $\text{O}_2$ ), formando a primeira ROS, o ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) (Green et al., 2004; Ferramosca e Zara, 2014). Durante este transporte, prótons de hidrogênio ( $\text{H}^+$ ) migram da área interna mitocondrial para o espaço inter membranas. Ao final da cadeia estes prótons geram energia e passam através do complexo V ou ATP sintase, originando uma molécula de ATP.

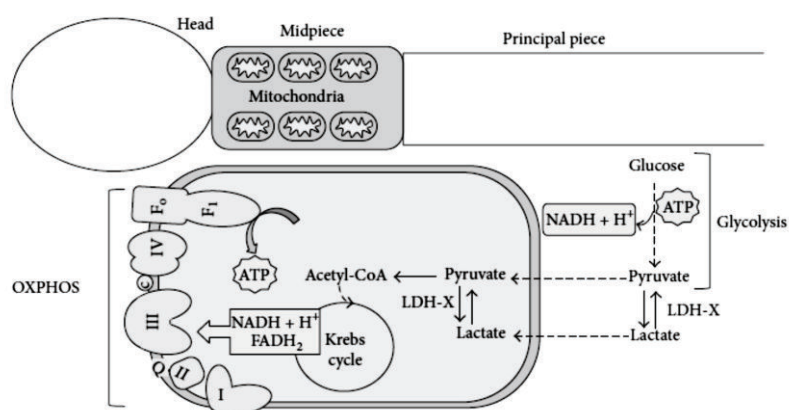


Figura 1. Compartimentalização sub-celular da fosforilação oxidativa (OXPHOS) e glicólise no espermatozoide. O sistema da OXPHOS é composto por cinco complexos. Transporte de elétron do complexo I ao IV é acompanhado por síntese de ATP. Moléculas redutoras (NADH e  $\text{FADH}_2$ ) produzidas pelas reações do ciclo de Krebs e glicólise são transferidas para a cadeia de transporte de elétrons da membrana. c - citocromo C; Q - ubiquinona. Fonte: Ferramosca e Zara (2014)

### 2.3 Radicais Livres

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

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

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

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

## 2.4 Espécies Reativas de Oxigênio

As ROS são formadas e degradadas por todos os organismos aeróbicos. São necessárias para o funcionamento celular normal, quando se encontram em concentrações fisiológicas. Por outro lado, quando em excesso, são prejudiciais e geram o estresse oxidativo (Nordberg e Arnér, 2001). Portanto, o funcionamento ideal do sistema aeróbico depende de um equilíbrio gerado entre as quantidades de ROS produzidas e removidas pelo sistema antioxidante celular (Halliwell e Gutteridge, 1999; Maia e Bicudo, 2009).

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

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

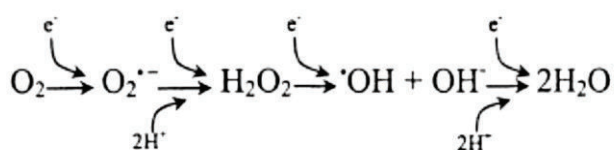


Figura 2. Redução tetraivalente do oxigênio molecular que ocorre na mitocôndria. Fonte: Nordberg e Arnér (2001)

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

### **2.4.1 Ânion superóxido**

O ânion superóxido é gerado, principalmente, na membrana mitocondrial de forma espontânea, através da cadeia respiratória. Parece ser o produto primário do sistema de formação de ROS. É um radical livre pouco reativo, formado após a primeira redução do oxigênio molecular, pela adição de um elétron. Esta ROS não possui capacidade de penetração através da membrana lipídica, agindo somente no compartimento onde é produzida. O ânion superóxido participa da formação do peróxido de hidrogênio através da ação da enzima superóxido dismutase (Nordberg e Arnér, 2001; Nichi, 2003; Maia e Bicudo, 2009; Andrade et al., 2010).

### **2.4.2 Peróxido de hidrogênio**

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

### **2.4.3 Radical hidroxila**

É um radical livre formado a partir do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) pela reação de Fenton, catalisada por íons ferro ( $\text{Fe}^{++}$ ) ou cobre ( $\text{Cu}^{++}$ ). Este radical é o mais reativo e nocivo dentre as ROS para o sistema biológico, sendo capaz de reagir rapidamente com as biomoléculas, desencadeando a peroxidação dos lipídeos através da retirada de um átomo de hidrogênio dos PUFA's da membrana celular (Nordberg e Arnér, 2001; Nichi, 2003; Maia e Bicudo, 2009; Andrade et al., 2010; Barbosa et al., 2010).

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

O metabolismo aeróbico está associado com a geração de moléculas pró-oxidantes, os radicais livres ou ROS. A homeostase intracelular é mantida através de uma complexa interação entre ROS e antioxidantes (Agarwal et al., 2006). Quando os

oxidantes sobrecarregam o sistema antioxidante de defesa celular, inicia-se um processo de estresse oxidativo.

Segundo Aitken (1995) a primeira indicação de que o estresse oxidativo pode afetar a viabilidade e a função espermática foi feita por MacLeod em 1943, quando observou que o espermatozoide humano incubado na presença de elevadas concentrações de oxigênio perdia rapidamente sua motilidade, e que a adição da catalase, um antioxidante enzimático, sob as mesmas condições, evitava essa perda. O autor sugeriu, ainda, que o agente causal não seria o  $O_2$  em si e, sim, o  $H_2O_2$ , gerado pela segunda eletro-redução do  $O_2$ , realizada pelos próprios espermatozoides.

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

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

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

O espermatozoide é uma célula aeróbia, portanto o oxigênio é essencial para o seu metabolismo. Sabe-se que, sob condições fisiológicas, as ROS são produzidas em

baixos níveis pelo espermatozoide, o que enfatiza sua importância em eventos específicos necessários à fecundação (Lamirande et al., 1997; Burnaugh et al., 2007).

Durante o processo de capacitação ocorre um aumento dos níveis de cálcio intracelular, ROS e da tirosina quinase, levando a uma maior produção da adenosina monofosfato cíclica (AMPC). Estes eventos induzem o espermatozoide a um estado de hiperativação. Sob estas condições, o espermatozoide passa pelo processo de reação acrossomal fisiológica, adquirindo a habilidade de fecundar (Aitken, 1995; Lamirande et al., 1997; Saalu, 2010).

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

Aitken (1995), comparando o sêmen de homens inférteis e férteis, constatou grande quantidade de ROS naqueles inférteis, atribuindo esse aumento aos espermatozoides defeituosos ou não funcionais. De fato, leucócitos e espermatozoides morfológica e funcionalmente anormais são os principais produtores endógenos de ROS no ejaculado (Maia e Bicudo, 2009).

À incubação de espermatozoides de garanhão na presença e ausência de neutrófilos ativados, Baumber et al. (2002) observaram aumento significativo na geração de  $H_2O_2$  e decréscimo na motilidade espermática total quando na presença de neutrófilos. Além disso, nos equinos, a produção de ROS é significativamente mais alta na presença de crioinjúrias e de espermatozoides com gota citoplasmática proximal ou anormalidades da peça intermediária (Ball et al., 2001; Ball, 2008).

## **2.6 Peroxidação Lipídica**

A peroxidação lipídica pode ser definida como uma cascata de eventos bioquímicos resultante da ação dos radicais livres sobre lipídeos poli-insaturados das membranas celulares. Os PUFA são excelentes alvos para ataques das ROS por possuírem uma ou mais duplas ligações em sua longa cadeia de carbonos. O processo de LPO é iniciado por reações das ROS com os PUFA e propagado por radicais peroxila.

A LPO resulta na formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos citotóxicos, tais como o malondialdeído (MDA), 4-hidroxynonenal e isoprostanos (Aitken, 1995; Nordberg e Arnér, 2001; Lima e Abdalla, 2001).

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

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

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

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

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

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

## 2.7 Sistema de Defesa Antioxidante

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

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

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

Fazem parte deste sistema, os antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Os antioxidantes enzimáticos são também denominados de agentes naturais, sendo o primeiro sistema de defesa a agir no organismo, neutralizando o excesso de ROS e prevenindo danos à estrutura celular. Fazem parte deste grupo, a superóxido dismutase

(SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) (Andrade et al., 2010; Luz et al., 2011).

### **2.7.1 Antioxidantes não enzimáticos**

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

#### **2.7.1.1 Vitamina E**

A vitamina E é a designação dada a um grupo de compostos antioxidantes lipossolúveis, encontrados em grande quantidade nos lipídeos presentes em membranas biológicas. Dentre as suas variações o  $\alpha$ -TOH é o mais potente e, geralmente, a forma predominante em sistemas biológicos. Este antioxidante bloqueia a etapa de propagação da peroxidação lipídica dos PUFA's das membranas e lipoproteínas, doando seu hidrogênio fenólico para os radicais peroxila, dando origem ao radical tocoferoxil, sendo este incapaz de continuar a reação oxidativa em cadeia. Desta forma, este antioxidante atua interrompendo a reação em cadeia da LPO (Nordberg e Arnér, 2001; Vasconcelos et al., 2007; Traber e Atkinson, 2007; Andrade et al., 2010; Carochio e Ferreira, 2013).

O  $\alpha$ -TOH e seu análogo hidrossolúvel, o trolox, foram testados por Ball et al. (2001) na refrigeração do sêmen equino a 5°C por 96 horas, para avaliar seus efeitos sobre a motilidade espermática. Segundo os autores, nenhum dos antioxidantes testados foi eficaz na preservação da motilidade espermática.

Na criopreservação do sêmen equino o  $\alpha$ -TOH foi testado em diversas concentrações (25  $\mu$ M até 1 mM) por Baumber et al. (2005), além do controle positivo constituído de 0,05% de etanol, o solvente orgânico do  $\alpha$ -TOH. A adição do  $\alpha$ -tocoferol não resultou em melhora das características espermáticas após a descongelação, porém o controle positivo apresentou diminuição do percentual de espermatozoides íntegros com acrossomo intacto, quando comparado ao grupo controle.

Em outros trabalhos o  $\alpha$ -TOH mostrou-se eficaz na prevenção da LPO, tanto durante a refrigeração a 5°C por 48 horas (Almeida e Ball, 2005), como à criopreservação do sêmen equino (Franco et al., 2013). Além disso, Yousefian et al. (2014), relatam maior percentual de espermatozoides com membranas íntegras, quando comparado ao controle e controle positivo, à refrigeração do sêmen equino por 48 horas.

Franco et al. (2013), investigaram os efeitos da suplementação com  $\alpha$ -tocoferol sobre a qualidade do sêmen equino criopreservado. O ejaculado foi diluído em meio Gent<sup>®</sup> e dividido em alíquotas contendo  $100 \times 10^6$  espermatozoides/mL, tendo o grupo controle e os seguintes tratamentos: 0,5; 1,0; e 2,0 mM. Após a descongelação as amostras foram mantidas a 37°C e as análises realizadas com 0, 60 e 120 minutos. Todas as concentrações testadas foram eficazes contra a LPO, preservando a integridade da membrana plasmática pós-descongelação.

#### **2.7.1.2 Coenzima Q10**

A CoQ10 é um agente lipossolúvel promotor de energia, cuja principal função é o transporte de elétrons e prótons no processo de produção de energia, levando à síntese de ATP na membrana mitocondrial interna, através da cadeia de transporte de elétrons, sendo encontrada em todas as membranas celulares de mamíferos (Lewin e Lavon, 1997; Patel e Sigman, 2008; Carocho e Ferreira, 2013). A CoQ10 pode ser encontrada em três estados redox: totalmente oxidada (ubiquinona, Q), parcialmente reduzida (semiquinona ou ubisemiquinona, SQ) e totalmente reduzida (ubiquinol, QH2 ou CoQH2) (Genova e Lenaz, 2011).

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

Na célula espermática a maior concentração de CoQ10 ocorre nas mitocôndrias presentes na peça intermediária, local de intensa produção de energia. Portanto, todo o

processo de síntese de ATP do gameta masculino é dependente da disponibilidade deste cofator, e uma deficiência do mesmo pode resultar em redução da motilidade espermática (Lewin e Lavon, 1997; Datta et al., 2009).

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

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

Em experimento realizado por Nadjarzadeh et al. (2012) foi avaliado o efeito da CoQ10 sobre a catalase, SOD e  $F_2$ -isoprostanos no plasma seminal de homens inférteis ( $n=47$ ) portadores de OAT idiopática. Os pacientes receberam 200 mg/dia de CoQ10 ( $n=23$ ) ou placebo ( $n=24$ ), durante três meses. Foi observado um aumento nos níveis de CoQ10 no plasma seminal pós-suplementação ( $44,74 \pm 36,47$  vs  $68,17 \pm 42,41$  ng/mL;  $p<0,001$ ). Além disso, o grupo que recebeu a CoQ10 teve maior atividade das enzimas catalase e SOD, acompanhado por diminuição do isoprostano ( $p=0,012$ ), um biomarcador para LPO. Houve correlação significativa entre as concentrações de CoQ10 e morfologia espermática normal ( $r=0,44$ ;  $p=0,037$ ), catalase ( $r=0,30$ ;  $p=0,041$ ) e SOD ( $r=0,60$ ;  $p<0,001$ ). Diante dos resultados constatou-se que suplementar pacientes portadores de OAT com CoQ10 por três meses pode atenuar o estresse oxidativo no plasma seminal, proporcionando uma melhoria das características seminais e atividade das enzimas antioxidantes.

Em estudo *in vitro* com amostras de sêmen oriundas de homens com astenozoospermia, Lewin e Lavon (1997) observaram aumento da motilidade após

incubação com 50  $\mu$ M de CoQ10 a 37°C por 24 horas, quando comparado ao controle ( $35,7 \pm 19,5\%$  vs  $19,1 \pm 9,3\%$ , respectivamente;  $p < 0,05$ ).

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

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

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

Para avaliar a preservação *in situ* a -10°C de espermatozoides da cauda do epidídimo de caprinos ( $n=80$ ), Datta et al. (2009) testaram três diluentes contendo lecitina de soja (SLG), CoQ10 (CoQ10G) e a associação de ambas (SLCoQ10G), preparados em meio livre de eletrólitos e contendo glicerol (G). As análises foram feitas após 7 (M-7) e 21 (M-21) dias de preservação, havendo diferença significativa entre os

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

## 2.8 Considerações Finais

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

## 3 REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R.K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.3, p.28-49, 2005.
- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SIKKA, S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v.18, p.325-332, 2006.
- AGARWAL, A.; MAKKER, K.; SHARMA, R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: An update. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.59, p.2-11, 2008.
- AITKEN, R.Y. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v.7, p.659-668, 1995.
- AITKEN, R.J.; LAMBOURNE, S.; GIBB, Z. The John Hughes memorial lecture: aspects of sperm physiology oxidative stress and the functionality of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.34, p.17-27, 2014.
- ALLEVA, R.; SCARARMUCCI, A.; MANTERO, F.; BOMPADRE, S.; LEONI, L.; LITTARRU, G.P. The protective role of ubiquinol-10 against formation of lipid hydroperoxides in human seminal fluid. **Molecular Aspects of Medicine**, v.18 (Supplement), p.s221-s228, 1997.
- ALMEIDA, A.; BALL, B. A. Effect of  $\alpha$ -tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.87, p.321-337, 2005.
- AMANN, R.P., GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: McKINNON, A.O., SQUIRES, E.L., VAALA, W.E., VARNER, D.D. **Equine Reproduction**. 2. ed. West Sussex: Wiley-Blackwell, cap.98, v.1. p.1053-1084, 2011.
- 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, n.2, p.79-85, 2010.
- AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.65-75, 2005.
- AURICH, C. Recent advances in cooled-semen technology. **Animal Reproduction Science**. v.107, p.268-275, 2008.

- AURICH, C.; SEEGER, P.; MULLER-SCHLOSSER, F. Comparison of different extenders with defined protein composition for storage of stallion spermatozoa at 5°C. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p.445-448, 2007.
- AURICH, J.E.; SCHONHERR, U.; HOPPE, H.; AURICH, C. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. **Theriogenology**, v.48, p.185-192, 1997.
- BALL, B.A. Oxidative stress in sperm. In: McCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**. 2. ed. West Sussex: Wiley-Blackwell, cap.98, v.1. p.991-995, 2011.
- BALL, B.A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impact of sperm function and preservation in the horse. **Animal Reproduction Science**, v.107, p.257-267, 2008.
- BALL, B.A.; MEDINA, V.; GRAVANCE, C.G.; BAUMBER, J. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. **Theriogenology**, v.56, p.577-589, 2001.
- BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; DE PAULA, S.O.; MINIM, V.P.R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v.23, n.4, p.629-643, 2010.
- BARRIER-BATTUT, I.; BONNET, C.; GIRAUDO, A.; DUBOIS, C.; CAILLAUD, M.; VIDAMENT, M. Removal of seminal plasma enhances membrane stability on fresh and cooled stallion spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v.48, p.64-71, 2013.
- BATELLIER, F.; VIDAMENT, M.; FAUQUANT, J.; DUCHAMP, G.; ARNAUD, G.; YVON, J.M.; MAGISTRINI, M. Advances in cooled semen technology. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.181-190, 2001.
- BAUMBER, J.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; MEDINA, V.; DAVIES-MOREL, M.C.G. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. **Journal of Andrology**, v.21, n.6, p.895-902, 2000.
- BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. **American Journal of Veterinary Research**, v.66, n.5, p.772-779, 2005.

- BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J.; MEYERS, S.A. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.24, n.4, p.621-628, 2003.
- BAUMBER, J.; VO, A.; SABEUR, K.; BALL, B.A. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.57, n.3, p.1025-1033, 2002.
- BENEDET, J.A.; SHIBAMOTO, T. Role of transitions metals, Fe(II), Cr(II), Pb(II) and Cd(II) in lipid peroxidation. **Food Chemistry**, v.107, p.165-168, 2008.
- BENTINGER, M.; BRISMAR, K.; DALLNER, G. The antioxidant role of coenzyme Q. **Mitochondrion**, v.7S, p.S41-S50, 2007.
- BRINSKO, S.P.; ROWAN, K.R.; VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L. Effects of transport container and ambient storage temperature on motion characteristics of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.53, p.1641-1655, 2000a.
- BRINSKO, S.P.; CROCKETT, E.C.; SQUIRES, E.L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoa motility after cooling and storage. **Theriogenology**, v.54, p.129–136, 2000b.
- BRINSKO, S.P.; BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D.; SCHUMACHER J.; LOVE C.C.; HINRICHS K.; HARTMAN, D. **Manual of Equine Reproduction**, 3. ed. MOSBY Elsevier, cap.12, p.160-175, 2011.
- BRUEMMERT, J.E.; COY, R.C.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. Effect of pyruvate on the function of stallion spermatozoa stored for up to 48 hours. **Journal of Animal Science**, v.80, p.12-18, 2002.
- BURNAUGH, L.; SABEUR, K.; BALL, B.A. Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium. **Theriogenology**, v.67, p.580-589, 2007.
- 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.
- CARVER, D.A.; BALL, B.A. Lipase activity in stallion seminal plasma and the effect of lipase on stallion spermatozoa during storage at 5 °C. **Theriogenology**, v.58, p.1587-1595, 2002.

- COCUZZA, M; SIKKA, S.C; ATHAYDE, K.S; ARGAWAL, A. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. **International Brazilian Journal of Urology**, v.33, n.5, p.603-621, 2007.
- CRANE, F.L.; NAVAS, P. The diversity of coenzyme Q function. **Molecular Aspects of Medicine**, v.18 (Supplement), p.s1-s6, 1997.
- DATTA, U.; SEKAR, M.C.; HEMBRAM, M.L.; DASGUPTA, R. Developments of a new method to preserve caprine cauda epididymal spermatozoa *in-situ* at – 10°C with electrolyte free medium. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.26, n.8, p.467-473, 2009.
- DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, A.E.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; OLMO, E.; BISBAL, A.; ROS-SANTAELLA, J.L.; GARDE, J.J. Comparison of the TBARS assay and BODIPY C<sub>11</sub> probes for assessing lipid peroxidation in red deer spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.360-368, 2010.
- DOUGLAS-HAMILTON, D.H.; OSOL, R.; OSOL, G., DRISCOLL, D., NOBLE, H. A field study of fertility of transported equine semen. **Theriogenology**, v.22, p.291-304, 1984.
- FARRÁS, M.C.; AVANZI, B.R., MELO, C.M., DELL'AQUA, J.A., PAPA, F.O. Efeito de diferentes diluentes na manutenção das características do sêmen eqüino em dois sistemas de refrigeração passiva. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, p.693-699, 2008.
- FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, A.E.; ESTESO, M.C.; GARDE, J.J.; MARTÍNEZ-PASTOR, F. Catalase supplementation on thawed bull spermatozoa abolishes the detrimental and DNA integrity. **International Journal of Andrology**, v.32, n.4, p.353-359, 2008.
- FERRAMOSCA, A., ZARA, V. Bioenergetics of mammalian sperm capacitation. **Biomed Research International**, v.2014, p.1-8, 2014.
- FERREIRA, A.L.A; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, n.1, p.61-68, 1997.

- FLESH, F.M.; GADELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1469, n.3, p.197-235, 2000.
- FRANCO, J.S.V.; CHAVEIRO, A.; GÓIS, A.; SILVA, F.M. Effects of  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid on equine semen quality after cryopreservation. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.33, p.787-793, 2013.
- GENOVA, M.L.; LENAIZ, G. New developments on the functions of coenzyme Q in mitochondria. **BioFactors**, v.37, n.5, p.330-354, 2011.
- GHARAGOZLOO, P.; AITKEN, R.J. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. **Human Reproduction**, v.26, n.7, p.1628-1640, 2011.
- GIBB, Z.; LAMBOURNE, S.R.; AITKEN, R.J. The paradoxical relationship between stallion fertility and oxidative stress. **Biology of Reproduction**, v.91, p.1-10, 2014.
- 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.
- GREEN, K.; BRAND, M.D.; MURPHY, M.P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, v.53, suppl.1, p.110-118, 2004.
- GUALTIERI, R.; BARBATO, V.; FIORENTINO, I.; BRAUN, S.; RIZOS, D.; LONGOBARDI, S.; TALEVI, R. Treatment with zinc, d-aspartate, and coenzyme Q10 protects bull sperm against damage and improves their ability to support embryo development. **Theriogenology**, v.82, p.592-598, 2014.
- GUASTI, P.N.; MONTEIRO, G.A.; PAPA, F.O. Componentes do plasma seminal e sua influência sobre a criopreservação e fertilidade de espermatozóides equinos, **Veterinária e Zootecnia**, v.19, n.2, p.169-180, 2012.
- HALLIWELL, B; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3. ed. New York: Oxford University, 1999. 936p.
- HOOGEWIJS, M.; RIJSSELAERE, T.; DE VliegHER, S.; VANHAESEBROUCK, E.; DE SCHAUWER, C.; GOVAERE, J.; THYS, M.; HOFACK, G.; VAN SOOM, A.; KRUIF, A. Influence of different centrifugation protocols on equine semen preservation. **Theriogenology**, v.74, p.118-126, 2010.

- INAGAKI, M.; KIKUCHI, M.; ORINO, K.; OHNAMI, Y.; WATANABE, K. Purification and quantification of lactoferrin in equine seminal plasma. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v.64, n.1, p.75-77, 2002.
- JASKO, D.J.; MORAN, D.M.; FARLIN, M.E.; SQUIRES, E.L. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. **Theriogenology**, v.35, n.6, p.1059-1067, 1991.
- JASKO, D.J.; HATHAWAY, J.A.; SCHALTENBRAND, V.L.; SIMPER, W.D.; SQUIRES, E.L. Effect of seminal plasma and egg yolk on motion characteristics of cooled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.37, p.1241-1252, 1992.
- JOHANNISSON, A.; LUNDGREN, A.; HUMBLLOT, P.; MORRELL, J.M. Naturally and stimulated levels of reactive oxygen species in cooled stallion semen destined for artificial insemination. **Animal**, doi:10.1017/S1751731114001499, p.1-9, 2014.
- KARESKOSKI, M.; KATILA, T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity, **Animal Reproduction Science**, v.107, p.249-256, 2008.
- KARESKOSKI, M.; SANKARI, S.; JOHANNISSON, A.; KINDAHL, H.; ANDERSSON, M.; KATILA, T. The association of the presence of seminal plasma and its components with sperm longevity in fractionated stallion ejaculates. **Reproduction in Domestic Animals**, v.46, p.1073-1081, 2011.
- KAWAKAMI, E.; TAKEMURA, A.; SAKUMA, M.; TAKANO, M.; HIRANO, T.; HORI, T. Superoxide dismutase and catalase activities in the seminal plasma of normozoospermic and asthenozoospermic Beagles. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v.69, p.133-136, 2007.
- KAYSER, J.P.; AMANN, R.P.; SHIDELER, R.K. Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.38, p.601-614, 1992.
- KOTHARI, S.; THOMPSON, A.; AGARWAL, A.; PLESSES, S.S. Free radicals: Their beneficial and detrimental effects on sperm functions. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.48, p.425-435, 2010.
- KOURY, J.C.; DONANGELO, C.M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**, v.16, n.4, p.433-441, 2003.
- LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v.2, p.48-54, 1997.

- LEWIN, A.; LAVON, H. The effect of coenzyme Q10 on sperm motility and function. **Molecular Aspects of Medicine**, v.18 (Supplement), p.s213-s219, 1997.
- LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciência Farmacêutica**, v.37, n.3, p.293-303, 2001.
- LOOMIS, P.R. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. **Veterinary Clinics Equine**, v.22, p.663-676, 2006.
- LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C.; F. CRESPO, F.; ARROYO, F.; FERNÁNDEZ, L.; ARANA, P.; JOHNSTON, S.D.; GOSÁLVEZ, J. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals II. The stallion. **Theriogenology**, v.68, p.1240-1250, 2007.
- LUZ, H.K.M.; WANDERLEY, L.S.; FAUSTINO, L.R.; SILVA, C.M.G.; FIGUEREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, n.2, p.956-969, 2011.
- MAIA, M.S.; BICUDO, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.4, p.183-193, 2009.
- MATA-CAMPUZANO, M.; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M.; OLMO, E.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; GARDE, J.J.; MARTÍNEZ-PASTOR, F. Quality, oxidative markers and DNA fragmentation of red deer thawed spermatozoa after incubation at 37 °C in presence of several antioxidants. **Theriogenology**, v.78, n.5, p.1005-1019, 2012a.
- MATA-CAMPUZANO, M.; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M.; ÁLVAREZ, M.; ANEL, L.; PAZ, P.; GARDE, J.J.; MARTÍNEZ-PASTOR, F. Effect of several antioxidants on thawed ram spermatozoa submitted a 37 °C up to 4 h. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.907-914, 2012b.
- MORTE, M.I.; RODRIGUES, A.M.; SOARES, D.; RODRIGUES, A.S.; GAMBOA, S.; RAMALHO-SANTOS, J. The quantification of lipid and protein oxidation in stallion spermatozoa and seminal plasma: Seasonal distinctions and correlations with DNA strand breaks, classical seminal parameters and stallion fertility. **Animal Reproduction Science**, v.106, p.36-47, 2008.

- NADJARZADEH, A.; SHIDFAR, F.; AMIRJANNATI, N.; VAFA, M.R.; MONTEVALIAN, S.A.; GOHARI, M.R.; NAZERI KAKHKI, S.A.; AKHONDI, M.M.; SADEGHI, M.R. Effect of coenzyme Q10 supplementation on antioxidant enzymes activity and oxidative stress of seminal plasma: a double-blind randomised clinical trial. **Andrologia**, v.46, n.2, p.177-183, 2012.
- NEAGU, V.R.; GARCÍA, B.M.; RODRÍGUEZ, A.M.; FERRUSOLA, C.O.; BOLAÑOS, J.M.G.; FERNÁNDEZ, L.G.; TAPIA, J.A.; PEÑA, F.J. Determination of glutathione peroxidase and superoxide dismutase activities in canine seminal plasma and its relation with sperm quality and lipid peroxidation post thaw. **Theriogenology**, v.75, p.10-16, 2011.
- NEILD, D.M.; BROUWERS, J.F.H.M.; COLENBRANDER, B.; AGUERO, A.; GADELLA, B.M. Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v.72, p.230-238, 2005.
- NEWCOMBE, J.R.; CUERVO-ARANGO, J. The effect of time of insemination with fresh cooled transported semen and natural mating relative to ovulation on pregnancy and embryo loss rates in the mare. **Reproduction in Domestic Animals**, v.46, n.4, p.678-681, 2011.
- NICHI, M. Sistema de proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídeos seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de Dourados, MS. 2003. 103p. **Dissertação (Mestrado)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária – Universidade de São Paulo, São Paulo.
- NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v.31, n.11, p.1287-1312, 2001.
- NUNES, D.B.; ZÚCCARI, C.E.S.N.; COSTA E SILVA, E.V. Fatores relacionados ao sucesso da inseminação artificial de éguas com sêmen refrigerado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.30, n.1/2, p.42-56, 2006.
- NUNES, D.B., ZORZATTO, J.R. COSTA E SILVA, E.V., ZÚCCARI, C.E.S.N. Efficiency of short-term storage of equine semen in a simple-design cooling system. **Animal Reproduction Science**, v.104, p.434–439, 2008.

- PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A.; DELL'AQUA JR, J.A.; MONTEIRO, G.A. Manual de andrologia e manipulação do sêmen equino. **Botupharma Biotecnologia Animal**. Disponível em: <www.botupharma.com.br>. Acesso em: 20 de novembro de 2014.
- PATEL, S.R.; SIGMAN, M. Antioxidant therapy in male infertility. **Urologic Clinics of North America**, v.35, p.319-330, 2008.
- PEÑA, F.J.; RODRÍGUEZ MARTÍNEZ, H.; TAPIA, J.A.; ORTEGA-FERRUSOLA, C.; GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, L.; MACÍAS GARCÍA, B. Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: A review. **Reproduction in Domestic Animals**, v.44, p.345-349, 2009.
- PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. Extension and storage of stallion spermatozoa: a review. **Equine Veterinary Science**, v.7, n.5, p.289-301, 1987.
- PROVINCE, C.A.; SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. Cooling rates, storage temperatures and fertility of extended equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.23, p.925-934, 1985.
- PUGLIESI, G. Viabilidade e fertilidade do sêmen equino resfriado a 5°C por 24 horas com dois diluidores. 2009. 123p. **Dissertação (Mestrado)** – Programa de Pós-graduação em Zootecnia – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.
- SAALU, L.C. The incriminating role of reactive oxygen species in idiopathic male infertility: An evidence based evaluation. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.13, n.9, p.413-422, 2010.
- SAFARINEJAD, M.R. Efficacy of coenzyme Q10 on semen parameters, sperm function and reproductive hormones in infertile men. **Journal of Urology**, v.182, n.1, p.237-248, 2009.
- SAFARINEJAD, M.R. The effect of coenzyme Q(10) supplementation on partner pregnancy rate in infertile men with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia: an open-label prospective study. **International Urology and Nephrology**, v.44, n.3, p.689-700, 2012.
- SAFARINEJAD, M.R.; SAFARINEJAD, S.; SHAFIEI, N.; SAFARINEJAD, S. Effects of the reduced form of coenzyme Q10 (ubiquinol) on semen parameters in men with idiopathic infertility: a double-blind, placebo controlled, randomized study. **Journal of Urology**, v.188, p.526-531, 2012.

- SANOCKA, D.; KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.2, p.12-19, 2004.
- SIES, H. Oxidative stress: Oxidant and antioxidant. **Experimental Physiology**, v.82, p.291-295, 1997.
- SOUZA, J.D.S.; FERREIRA, W.M. O papel da vitamina E na nutrição e reprodução animal – Meios de defesa contra os radicais livres. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.4, n.3, p.456-461, 2007.
- SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K.; VANDERWALL, D.K.; McCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E. Cooled and frozen stallion semen. **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory**. Fort Collins, Bulletin No 9, p.01-38, 1999.
- TALEVI, R.; BARBATO, V.; FIORENTINO, I.; BRAUN, S.; LONGOBARDI, S.; GUALTIERI, R. Protective effects of in vitro treatment with zinc, d-aspartate and coenzyme Q10 on human sperm motility, lipid peroxidation and DNA fragmentation. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.11, n.81, p.1-10, 2013.
- TOPFER-PETERSEN, E.; EKHLASI-HUNDRIESER, M.; KIRCHHOFF, C.; LEEB, T.; SIEME, H. The role of stallion seminal proteins in fertilization. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.159-170, 2005.
- TURUNEN, M.; OLSSON, J.; DALLNER, G. Metabolism and function of coenzyme Q. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1660, p.171-199, 2004.
- TRABER, M.G.; ATKINSON, J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. **Free Radical Biology and Medicine**, v.43, p.4-15, 2007.
- TROEDSSON, M.H.T.; DESVOUSGES, A.S.; ALGHAMDI, A.S.; DAHMS, B.; DOW C.A.; HAYNA, J.; VALESCO, R.; COLLAHAN, P.T.; MACPHERSON, M.L.; POZOR, M.; BUHI, W.C. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.171-186, 2005.
- VALENÇA, R.M.B.; GUERRA, M.M.P. Espécies reativas ao oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.1, p.47-53, 2007.
- VALLE, G.R.; SILVA-FILHO, J.N.; PALHARES, M.S.; MELO, M.A.; MAGNAGO, L.G.P. Utilização de um contêiner modelo Celle modificado para resfriamento e transporte de sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, p.505-514, 1999.

- VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.L.; GARCIA, M.M.; KENNEY, R.M. Effects of semen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**, v.28, p.709-723, 1987.
- VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; LOVE, C.L.; GARCIA, M.C.; KENNEY, R.M. Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**, v.29, p.1043-1053, 1988.
- VARNER, D.D.; GIBB, Z.; AITKEN, R.J. Stallion fertility: a focus on the spermatozoon. **Equine Veterinary Journal**, v.47, n.1, p.16-24, 2014.
- VASCONCELOS, S.M.L.; GOULART, M.O.F.; MOURA, J.B.F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.30, n.5, p.1323-1338, 2007.
- VENKATESH, S.; RIYAZ, A.M.; SHAMSI, M.B.; KUMAR, R.; GUPTA, N.P.; MITTAL, S.; MALHOTRA, N.; SHARMA, R.K.; AGARWAL, A.; DADA, R. Clinical significance of reactive oxygen species in semen of infertile indian men. **First International Journal of Andrology**, v.41, p.251-256, 2009.
- YOUSEFIAN I.; ZARE-SHAHNEH, A.; MAHDI ZHANDI, M. The effect of Coenzyme Q10 and  $\alpha$ -Tocopherol in skim milk-based extender for preservation of Caspian stallion. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.34, p.949-954, 2014.

## ARTIGO

COENZIMA Q10 E  $\alpha$ -TOCOFEROL PREVINEM A LIPOPEROXIDAÇÃO DO SÊMEN EQUINO REFRIGERADOBG Nogueira<sup>1</sup>, CESN Zúccari<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Professora Doutora da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – FAMEZ / UFMS. E-mail:

[carmem.zuccari@ufms.br](mailto:carmem.zuccari@ufms.br)

**RESUMO** - As biotécnicas aplicadas ao sêmen equino promovem um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e redução da defesa antioxidante natural, tanto pela diluição como eliminação do plasma seminal. Os objetivos deste trabalho foram avaliar o efeito da adição de Coenzima Q10 (CoQ10) e  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -TOH), isoladamente e em associação, sobre as variáveis espermáticas, e a eficácia dos mesmos na prevenção da lipoperoxidação do sêmen equino, durante refrigeração a 5°C por 72 horas. Foram utilizados dez garanhões adultos de fertilidade comprovada, obtendo-se dois ejaculados por reprodutor, submetendo-os aos seguintes tratamentos: C=controle (sem adição de antioxidantes); EtOH=controle positivo etanol (100  $\mu$ L etanol);  $\alpha$ -TOH=2 mM; CoQ10=40  $\mu$ g/mL e CoQ10 +  $\alpha$ -TOH=40  $\mu$ g/mL + 2 mM. O grupo da CoQ10 apresentou maior percentual de espermatozoides móveis ( $69,1 \pm 16,2\%$ ) quando comparado ao controle ( $62,1 \pm 16,2\%$ ) e EtOH ( $58,1 \pm 18,6\%$ ), bem como o vigor, com escores superiores aos demais tratamentos ( $p < 0,05$ ). Os grupos CoQ10 +  $\alpha$ -TOH e  $\alpha$ -TOH foram os mais eficazes na prevenção da lipoperoxidação em comparação ao controle ( $1.765,9 \pm 695,9$ ;  $1.890,8 \pm 749,5$ ;  $2.506,2 \pm 769,4$  ng MDA/ $10^8$  spz, respectivamente). Conclui-se que a CoQ10 e o  $\alpha$ -TOH foram eficazes, durante a refrigeração do sêmen equino a 5°C por 72 horas, em proporcionar maiores valores de motilidade total e vigor espermáticos, bem como menor lipoperoxidação.

**Palavras-chave:** antioxidante não enzimático, garanhão, ROS

**CONTENTS** - Biotechnology applied for equine semen promotes an increasing on reactive oxygen species levels production and reduction of the natural antioxidant defense, by both dilution and removal of seminal plasma. So, the aims of this study were to evaluate the effect of adding Coenzyme Q10 (CoQ10) and  $\alpha$ -tocopherol ( $\alpha$ -TOH), singly and in combination, on sperm parameters, and their effectiveness in preventing lipid peroxidation of equine semen during cooling at 5 °C for 72 hours. Ten adult stallions of proven fertility were used, using two ejaculates each, subjecting them to the following treatments: C=control (without addition of antioxidants); EtOH= positive control (100  $\mu$ L ethanol);  $\alpha$ -TOH=2 mM; CoQ10=40  $\mu$ g/mL and CoQ10 +  $\alpha$ -TOH= 40  $\mu$ g/mL + 2 mM. The CoQ10 group had a higher percentage of mobile spermatozoa ( $69.1 \pm 16.2\%$ ) compared to control ( $62.1 \pm 16.2\%$ ) and EtOH ( $58.1 \pm 18.6\%$ ), and sperm vigor had the higher scores than the other treatments ( $p < 0.05$ ). CoQ10 +  $\alpha$ -TOH and  $\alpha$ -TOH groups were most effective in preventing lipid peroxidation compared to controls ( $1,765.9 \pm 695.9$ ,  $1890.8 \pm 749.5$ ,  $2506.2 \pm 769.4$  ng MDA/ $10^8$  spz, respectively). In conclusion, CoQ10 and  $\alpha$ -TOH were effective during cooling process of equine semen at 5 °C for 72 hours, providing increased levels of total motility and sperm vigor, as well as lower lipid peroxidation.

**Keywords:** non-enzymatic antioxidant, ROS, stallion

## INTRODUÇÃO

A biotecnologia de refrigeração do sêmen proporciona uma longevidade à célula espermática de aproximadamente 48 horas (Newcombe e Cuervo-Arango 2011), período este usado para o transporte das doses de sêmen a serem utilizadas na inseminação artificial, prática que ao longo dos últimos anos teve aumento expressivo (Johannisson et al. 2014).

A manipulação, o armazenamento e a refrigeração do sêmen equino causam um aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS; Aurich et al. 1997), radicais livres normalmente produzidos em organismos aeróbicos, necessários para os processos

fisiológicos da capacitação espermática e reação acrossomal (Agarwal et al. 2006). Porém, quando produzidas em excesso ou quando o sistema antioxidante de defesa celular é insuficiente, geram um quadro de estresse oxidativo (Kothari et al. 2010), o que pode levar a lesões irreversíveis da membrana plasmática, através de um processo denominado de lipoperoxidação (LPO; Aitken 1995). Além disso, também são relatados danos à cromatina e ocorrência de apoptose (Gharagozloo e Aitken 2011).

As pesquisas buscam obter o potencial fecundante máximo do ejaculado de um garanhão através de estratégias como a remoção do plasma seminal (Barrier-Battut et al. 2013), utilização do complexo colesterol-ciclodextrina (Hartwig et al. 2014) e a adição de antioxidantes ao meio de diluição (Aurich et al. 1997; Ball et al. 2001; Franco et al. 2013; Yousefian et al. 2014).

Nesse sentido, um antioxidante não enzimático lipossolúvel, o  $\alpha$ -tocoferol ( $\alpha$ -TOH), forma predominante da vitamina E em sistemas biológicos (Traber e Atkinson 2007), tem sido testado, pois sua incorporação ao meio de diluição vem apresentando efeitos benéficos ao sêmen equino (Almeida e Ball 2005; Franco et al. 2013). Da mesma forma, a coenzima Q10 (CoQ10), considerada como o único antioxidante lipossolúvel sintetizado endogenamente (Turunen et al. 2004), também desempenha um papel bioenergético no metabolismo mitocondrial (Lewin e Lavon 1997). Sua associação ao  $\alpha$ -TOH, na refrigeração do sêmen equino, mostrou-se eficaz na manutenção da motilidade, integridade e funcionalidade da membrana plasmática e na prevenção da LPO (Yousefian et al. 2014).

Desta forma, os objetivos do presente experimento foram avaliar o efeito da adição da CoQ10 e do  $\alpha$ -TOH ao diluente de refrigeração, isoladamente ou em associação, sobre as características do sêmen equino mantido a 5°C por 72 horas e a eficácia destes antioxidantes na prevenção da lipoperoxidação.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS**

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Fundação Universidade

Federal de Mato Grosso do Sul. Foram utilizados ejaculados de garanhões adultos com fertilidade comprovada, com idades entre 6 e 17 anos, alojados em propriedades próximas a Campo Grande/MS.

Para a composição dos grupos experimentais, os antioxidantes foram adicionados ao sêmen diluído em meio à base de leite desnatado (Equimix<sup>®</sup>, Nutricell, Campinas, São Paulo, Brasil), nas seguintes concentrações: CoQ10 – 40 µg/mL,  $\alpha$ -TOH – 2 mM, CoQ10 +  $\alpha$ -TOH associados nas mesmas concentrações e o controle positivo do etanol (EtOH – 100 µL), solvente utilizado no preparo do  $\alpha$ -TOH.

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

Foram realizadas duas colheitas de sêmen por garanhão, totalizando 20 ejaculados, utilizando vagina artificial modelo Botucatu (Botupharma<sup>®</sup>, Botucatu, São Paulo, Brasil), mantida a uma temperatura entre 42 e 45°C, com auxílio de manequim ou de uma fêmea em estro, durante os meses de julho a setembro de 2014.

O ejaculado foi mantido em banho-maria a 37°C durante as análises da motilidade subjetiva (0-100%) e vigor (escore 0-5). Somente ejaculados com motilidade  $\geq 70\%$  e vigor  $\geq 3$  prosseguiram à refrigeração. Após a colheita e avaliação seminais, diluiu-se uma alíquota contendo  $1 \times 10^9$  espermatozoides em Equimix<sup>®</sup>, obtendo-se uma concentração de  $50 \times 10^6$  espermatozoides / mL. O sêmen foi transportado para o laboratório em contêiner a 15°C (Max-Sêmen<sup>®</sup>; EHG Agrofarma, Mogi-Mirim, São Paulo, Brasil), em intervalo  $\leq 1$  hora após a colheita.

### **PROCESSAMENTO E REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN**

Para a remoção do plasma seminal a amostra foi centrifugada a 600 G por 10 minutos, o sobrenadante desprezado e o *pellet* ressuspendido em Equimix<sup>®</sup>, a uma concentração de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Fracionou-se o volume final em cinco alíquotas de  $200 \times 10^6$  espermatozoides, adicionando os antioxidantes e o etanol. As amostras foram estocadas a 5°C em contêiner isotérmico (CP; Nunes et al. 2008), sendo mantidas sob refrigeração por 72 horas. A cada 24 horas as bombonas de gelo reciclável eram substituídas e amostras de sêmen retiradas para as análises laboratoriais.

### **ANÁLISE DO SÊMEN**

As avaliações seminais foram realizadas antes da refrigeração (M-0) e às 24 (M-24), 48 (M-48) e 72 (M-72) horas, momentos em que amostras de 600  $\mu$ L de cada tratamento eram retiradas do contêiner e mantidas a 37°C por 10 minutos, para então serem submetidas às análises de motilidade subjetiva, vigor, integridade da membrana plasmática, fragmentação da cromatina, atividade mitocondrial e suscetibilidade à lipoperoxidação.

### **MOTILIDADE/VIGOR E CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICAS**

A estimativa da motilidade e vigor foi do tipo “cega”, realizada pelo mesmo técnico, sendo feita pela deposição de 10  $\mu$ L de sêmen entre lâmina e lamínula, pré-aquecidas a 37°C em mesa aquecedora (WTA, Cravinhos, São Paulo, Brasil), sob a microscopia de contraste de fase (Zeiss, Jena, Alemanha), em aumento de 200x.

Para a estimativa da concentração espermática, 20  $\mu$ L de sêmen foram diluídos em 2.000  $\mu$ L de água deionizada e a contagem feita em Câmara de Neubauer, sendo o resultado expresso em milhões de espermatozoides por mL.

### **INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA**

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

### **ATIVIDADE MITOCONDRIAL**

A avaliação da atividade mitocondrial foi realizada pela coloração com 3,3'-diaminobenzidina (DAB), segundo técnica de Hrudka (1987), incubando-se 20  $\mu$ L de sêmen + 20  $\mu$ L do corante a 37°C por 1 hora. A seguir fazia-se o esfregaço e o fixava em formol a 10% por 10 minutos. As lâminas eram analisadas em microscopia de contraste de fase, com aumento de 1.000x, contadas 200 células e classificadas de

acordo com o grau de coloração da peça intermediária, em quatro classes: DAB I - peça intermediária totalmente corada, logo alta atividade mitocondrial; DAB II -  $\geq 50\%$  da peça intermediária corada, indicando média a alta atividade mitocondrial; DAB III - peça intermediária  $< 50\%$  corada, apontando baixa atividade mitocondrial e; DAB IV - peça intermediária não corada, portanto, ausência de atividade mitocondrial.

### **FRAGMENTAÇÃO DA CROMATINA**

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

Para a avaliação sob a microscopia de campo claro, em aumento de 1.250x, 20  $\mu\text{L}$  de solução de azul de toluidina a 0,025% em tampão McIlvaine eram depositados entre lâmina e lamínula e feita a contagem de 500 células, considerando-se duas categorias: cromatina fragmentada - cabeça espermática corada em azul escuro ou violeta e; cromatina íntegra – cabeça espermática corada em azul claro.

### **SUSCETIBILIDADE À PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA**

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

### **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

O delineamento experimental foi em parcelas subdivididas, considerando-se a adição da CoQ10,  $\alpha$ -tocoferol e CoQ10 +  $\alpha$ -tocoferol como tratamentos e os momentos

de avaliação como subparcelas. Para comparar as variáveis dependentes (motilidade/vigor, integridade da membrana plasmática, fragmentação da cromatina, atividade mitocondrial e lipoperoxidação) empregou-se a análise de variância, pelo procedimento GLM do Programa Estatístico SAS (2001), considerando os efeitos fixos de tratamento e momentos de avaliação seminal. As médias foram comparadas pelo teste de Duncan, em nível de 5% de significância. As variáveis expressas em porcentagem foram transformadas em arco seno ( $x/100$ ), de acordo como o sugerido por Sampaio (2007).

## RESULTADOS

Os valores médios das variáveis seminais pré-refrigeração (M-0) foram: motilidade –  $78,04 \pm 4,1\%$ ; vigor –  $3,6 \pm 0,5$ ; íntegros –  $73,01 \pm 15,9\%$ ; cromatina fragmentada –  $3,9 \pm 1,6\%$ ; células com alta atividade mitocondrial igual a  $38,3 \pm 17,1\%$  e nível de lipoperoxidação de  $1.543,5 \pm 1.295,9$  ng MDA /  $1 \times 10^8$  espermatozoides.

À análise dos dados constatou-se que não houve interação significativa entre os momentos estudados e os tratamentos testados.

No decorrer do período de refrigeração a motilidade/vigor e o percentual de células da classe DAB I apresentaram queda significativa de seus valores, enquanto o nível de lipoperoxidação não diferiu ao longo do tempo (Tabela 1).

Tabela 1. Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) das variáveis espermáticas durante a refrigeração a 5°C do sêmen equino acrescido de CoQ10,  $\alpha$ -tocoferol e etanol

| Variáveis                                 | Tempo de Refrigeração (horas) |                              |                              |
|-------------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|
|                                           | M-24                          | M-48                         | M-72                         |
| Motilidade (%)                            | 71,3 $\pm$ 12,4 <sup>a</sup>  | 62,5 $\pm$ 17,9 <sup>b</sup> | 56,3 $\pm$ 20,7 <sup>c</sup> |
| Vigor (0 – 5)                             | 3,8 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>    | 3,4 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>   | 3,1 $\pm$ 0,8 <sup>c</sup>   |
| Íntegros (%)                              | 34,2 $\pm$ 13,5 <sup>a</sup>  | 28,2 $\pm$ 10,0 <sup>b</sup> | 25,2 $\pm$ 9,9 <sup>b</sup>  |
| DNA Fragmentado (%)                       | 4,1 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>    | 4,5 $\pm$ 1,3 <sup>ab</sup>  | 4,6 $\pm$ 1,4 <sup>b</sup>   |
| DAB I (%)                                 | 23,5 $\pm$ 13,9 <sup>a</sup>  | 14,2 $\pm$ 8,8 <sup>b</sup>  | 8,8 $\pm$ 6,3 <sup>c</sup>   |
| TBARS [ng MDA/<br>1x10 <sup>8</sup> spzt] | 2.219,8 $\pm$ 843,8           | 2.090,1 $\pm$ 906,3          | 2.223,1 $\pm$ 937,0          |

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

DAB I – alta atividade mitocondrial; TBARS – espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico; MDA - malondialdeído; spzt – espermatozoide

Os tratamentos com os antioxidantes, isolados ou em associação (Tabela 2), proporcionaram os maiores percentuais de espermatozoides móveis, sendo que o grupo da CoQ10 resultou em valor significativamente superior àqueles dos grupos controle e EtOH-100. O escore para o vigor, por sua vez, foi maior no tratamento com CoQ10 quando comparado a todos os demais tratamentos (p<0,05).

O percentual de células com membrana plasmática íntegra foi maior no grupo da CoQ10, quando comparada ao tratamento EtOH-100, contudo ambos não diferiram dos demais tratamentos.

Durante o período de refrigeração, os espermatozoides não apresentaram aumento de células com fragmentação da cromatina, o mesmo sendo observado no que se refere à presença de gametas com alta atividade mitocondrial.

O nível de lipoperoxidação foi significativamente menor no grupo tratado com CoQ10 +  $\alpha$ -TOH, contudo não diferindo do  $\alpha$ -TOH (p>0,05). Já os grupos controle e EtOH-100 não diferiram entre si, mas apresentaram os maiores níveis de peroxidação lipídica (p<0,05) em comparação com os demais tratamentos.

Tabela 2. Valores médios ( $\pm$  desvio padrão) das variáveis espermáticas durante refrigeração por 72 horas a 5°C do sêmen equino incubado com antioxidantes não enzimáticos isolados ou em associação

| Variáveis                                 | Tratamentos                      |                                   |                                  |                                   |                                               |
|-------------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------------|
|                                           | Controle                         | EtOH100<br>(100 $\mu$ L)          | CoQ10<br>(40 $\mu$ g/mL)         | $\alpha$ -TOH<br>(2 mM)           | CoQ10 + $\alpha$ -TOH<br>(40 $\mu$ g/mL+2 mM) |
| Motilidade (%)                            | 62,1 $\pm$ 16,2 <sup>bc</sup>    | 58,1 $\pm$ 18,6 <sup>c</sup>      | 69,1 $\pm$ 16,2 <sup>a</sup>     | 65,0 $\pm$ 17,7 <sup>ab</sup>     | 62,5 $\pm$ 21,3 <sup>abc</sup>                |
| Vigor (0-5)                               | 3,3 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>       | 3,2 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>        | 3,7 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>       | 3,4 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>        | 3,3 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>                    |
| Íntegros (%)                              | 30,3 $\pm$ 13,0 <sup>ab</sup>    | 25,9 $\pm$ 10,3 <sup>b</sup>      | 32,2 $\pm$ 12,2 <sup>a</sup>     | 28,6 $\pm$ 11,0 <sup>ab</sup>     | 28,9 $\pm$ 11,8 <sup>ab</sup>                 |
| DNA Fragmentado (%)                       | 4,6 $\pm$ 1,5                    | 4,7 $\pm$ 1,3                     | 4,0 $\pm$ 1,5                    | 4,3 $\pm$ 1,3                     | 4,4 $\pm$ 1,3                                 |
| DAB I (%)                                 | 16,3 $\pm$ 13,2                  | 13,2 $\pm$ 12,4                   | 16,4 $\pm$ 11,4                  | 16,4 $\pm$ 10,4                   | 15,2 $\pm$ 11,6                               |
| TBARS (ng MDA/ 1x10 <sup>8</sup><br>sptz) | 2.506,2 $\pm$ 769,4 <sup>c</sup> | 2.636,5 $\pm$ 1100,3 <sup>c</sup> | 2.089,8 $\pm$ 766,0 <sup>b</sup> | 1.890,8 $\pm$ 749,5 <sup>ab</sup> | 1.765,9 $\pm$ 695,9 <sup>a</sup>              |

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

EtOH = etanol; CoQ10 = coenzima Q10;  $\alpha$ -TOH =  $\alpha$ -tocoferol; DAB I – alta atividade mitocondrial; TBARS – espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico; MDA – malondialdeído; sptz = espermatozoide

## DISCUSSÃO

A membrana plasmática do espermatozoide equino é composta por proteínas, carboidratos e uma bicamada lipídica rica em ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs; Amann e Graham 2011), o que torna os gametas muito suscetíveis ao processo de LPO (Kothari et al. 2010), a qual altera a estrutura, a permeabilidade e a fluidez da membrana (Ferreira e Matsubara 1997; Maia e Bicudo 2009). O armazenamento do sêmen equino refrigerado por longos períodos pode desencadear processos bioquímicos como a LPO, induzir a apoptose através do estresse oxidativo, levar à fragmentação da cromatina e causar redução da fertilidade (López-Fernández et al. 2007; Graham 2011).

No presente trabalho, os antioxidantes  $\alpha$ -TOH e CoQ10 foram adicionados no diluente de refrigeração, com o intuito de reduzir os danos causados pela LPO, durante o armazenamento por 72 horas.

Recentemente, foi relatada correlação negativa entre os níveis de peróxido de hidrogênio e motilidade progressiva, integridade da cromatina e a taxa de gestação, sugerindo que as ROS possam ser um dos fatores determinantes da redução da fertilidade em equinos (Johannisson et al. 2014). Paradoxalmente, Gibb et al. (2014), encontraram correlação positiva entre níveis de ROS e fertilidade do sêmen equino. Além disso, sugeriram que as ROS sejam um simples subproduto gerado como consequência de alta atividade mitocondrial, e que os ejaculados mais férteis, portanto, apresentem maiores níveis de estresse oxidativo. Contudo, tais amostras apresentaram menor viabilidade espermática e integridade acrossomal, originando a premissa, que espermatozoides de equino “live fast and die young”, enfatizando o papel nocivo das ROS em longo prazo, principalmente durante o armazenamento.

Os resultados obtidos demonstram que a CoQ10 e o  $\alpha$ -TOH foram eficazes na preservação da motilidade e vigor espermáticos. Da mesma forma, a incubação de amostras de sêmen na presença da CoQ10 preservou a motilidade espermática total e progressiva em humanos portadores de astenozoospermia (Lewin e Lavon 1997) e em homens normospermicos (Talevi et al. 2013), bem como no sêmen criopreservado de touros (Gualtieri et al. 2014). O  $\alpha$ -TOH na espécie suína também proporcionou maior preservação da motilidade espermática durante o processo de criopreservação (Satorre et al. 2007), sendo que em equinos o mesmo foi observado por Yousefian et al. (2014) quando utilizaram a associação de CoQ10 e  $\alpha$ -TOH durante a refrigeração do sêmen a 5°C por 48 horas.

A motilidade é o processo que requer a maior demanda de energia e apresenta uma correlação positiva com as concentrações de ATP (Januskauskas e Rodriguez-Martinez 1995). Portanto, a atividade mitocondrial indica a capacidade do espermatozoide produzir ATP e está positivamente correlacionada com a motilidade e a viabilidade celular (Garner et al. 1997). Segundo Baumber et al. (2000) a motilidade espermática parece ser o indicador mais sensível do estresse oxidativo, pois sua queda é constatada antes do surgimento de qualquer valor mensurável da LPO. O processo de produção de ATP no gameta masculino é dependente da disponibilidade de CoQ10 e a deficiência deste cofator pode resultar em redução da motilidade (Lewin e Lavon 1997). Portanto, a preservação da motilidade e vigor espermáticos obtida no presente trabalho pode ser explicada pela função bioenergética da CoQ10, a qual se dá através do transporte de prótons e elétrons na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, levando à síntese de ATP (Lewin e Lavon 1997; Patel e Sigman 2008; Carochio e Ferreira 2013). Outro fato importante a ser considerado, sob o aspecto metabólico, é quanto o espermatozoide equino é extremamente dependente da fosforilação oxidativa (OXPHOS; Gibb et al. 2014; Varner et al. 2014), portanto, uma maior eficiência da OXPHOS mitocondrial pode trazer benefícios para a motilidade espermática (Yousefian et al. 2014).

Casey et al. (1993) verificaram, para o sêmen equino fresco, alta correlação entre espermatozoides viáveis e função mitocondrial ( $r = 0,99$ ). Neste experimento, não foi detectado efeito benéfico da adição dos antioxidantes não enzimáticos sobre a IMP, exceto para o grupo CoQ10 quando comparado ao controle positivo do etanol.

Farrás et al. (2008) relatam valores superiores aos observados neste trabalho, para a IMP avaliada pela epifluorescência, após 24 horas de refrigeração do sêmen equino ( $34,2 \pm 13,5\%$  vs  $63,58 \pm 10,71\%$ , respectivamente), porém, os autores não adicionaram antioxidantes nem submeteram as amostras à centrifugação. Considerando que a centrifugação do sêmen pode ser nociva e resultar em lesões na membrana plasmática, decorrentes do atrito na parede dos tubos cônicos e a pressão causada pelo acúmulo de células no fundo do tubo (Aurich 2008), é possível que a centrifugação para remover o plasma seminal possa explicar a diferença de resultados encontrada entre os trabalhos. No entanto, em amostras submetidas à centrifugação, com remoção do plasma seminal, Barrier-Battut et al. (2013) detectaram maior viabilidade espermática ( $\sim 60\%$ ), pelo teste hiposmótico, durante a refrigeração do sêmen equino a  $4^\circ\text{C}$  após 48 horas de armazenamento ( $28,2 \pm 10,0\%$ ).

Avaliando a viabilidade espermática pela eosina-nigrosina, Cocchia et al. (2011) observaram resultados superiores para IMP, de  $73,0 \pm 6,7$ ,  $54,0 \pm 4,2$  e  $41,0 \pm 7,2\%$ , sem centrifugação, às 24, 48 e 72 horas de refrigeração, respectivamente, sendo os valores deste trabalho para os mesmos momentos de avaliação iguais a  $34,2 \pm 13,5$ ,  $28,2 \pm 10,0$  e  $25,2 \pm 9,9$ , portanto inferiores àqueles relatados pelos autores. As diferenças entre os testes estão de acordo com o relatado por Brito et al. (2003), em que a proporção de espermatozoides com membrana plasmática intacta é superestimada pela eosina/nigrosina quando comparada aos valores obtidos com os corantes fluorescentes, tendo como possível explicação para essa diferença entre métodos, o tempo de exposição aos corantes, que varia de poucos segundos para eosina/nigrosina a 10 - 30 minutos, no caso dos corantes fluorescentes.

A composição de PUFA's da membrana espermática e a proporção colesterol:fosfolipídeos estão estreitamente relacionadas à sua fluidez e resistência ao choque térmico pelo frio, respectivamente, fatores estes que explicam e afetam a qualidade seminal em geral (Aurich 2005; Macías-García et al. 2011).

Devido à alta concentração de PUFA's, os espermatozoides são altamente sensíveis aos efeitos nocivos das ROS (Kothari et al. 2010), e sua produção é aumentada durante a refrigeração (Aurich 1997), com as lesões na membrana plasmática decorrentes da LPO sendo uma das principais consequências do estresse oxidativo (Aitken 1995). Assim, esperava-se que a adição e associação de antioxidantes lipossolúveis proporcionariam um efeito protetor sobre a IMP, conforme demonstrado por Yousefian et al. (2014); no entanto, tal ação não foi constatada e, talvez, a diferença de resultados possa ser atribuída às distintas concentrações dos antioxidantes que foram usadas (CoQ10 –  $40 \mu\text{g/mL}$  vs  $0,86 \mu\text{g/mL}$  e  $\alpha\text{-TOH}$  –  $2 \text{ mM}$  vs  $5 \text{ mM}$ , respectivamente), uma vez que a concentração inapropriada de antioxidantes pode ser maléfica e atuar como estimulante da oxidação (Breininger et al. 2005).

Vale ainda ressaltar que durante a refrigeração ocorre a transição de fase dos lipídeos da membrana, do estado líquido-cristalino para o gel, com subsequente reorganização desses lipídeos, o que pode resultar na formação da fase hexagonal-II, modificações que culminam em ruptura ou alteração na permeabilidade da membrana plasmática (Squires et al. 1999). Assim, o baixo percentual de IMP apresentado em todos os momentos avaliados neste experimento poderia, supostamente, ser explicado pelos efeitos do estresse térmico pelo frio, e não pela ação das ROS, principalmente pelo fato da LPO ter sido eficazmente reduzida nos grupos tratados com antioxidantes, corroborando com Baumber et al. (2000), em que o

aumento induzido na geração de ROS, não resultou em queda significativa da viabilidade espermática. No entanto, o sistema de refrigeração passiva utilizado neste experimento (CP), se mostrou eficiente na preservação da IMP, não diferindo do contêiner comercial Equitainer® (Nunes et al. 2008), minimizando, assim, a possibilidade da ocorrência do choque térmico pelo frio.

As causas mais frequentes de anormalidades na estrutura da cromatina são: deficiência na recombinação durante a espermatogênese conduzindo à apoptose da célula, maturação anormal da espermatíde e estresse oxidativo. Qualquer anormalidade no DNA pode resultar em infertilidade do macho, já tendo sido observado um decréscimo progressivo da fertilidade quando mais de 30% das células espermáticas apresentam lesões (Agarwal e Said 2003). Evenson e Jost (2000), em estudo com humanos, touros, garanhões e cachacos, relataram que a percentagem de espermatozoides com DNA desnaturado, expressa pelo índice de fragmentação do DNA (DFI), tem permitido classificar o potencial de fertilidade em baixo ( $\geq 30\%$ ), moderado (16 – 29%) e alto (0 – 15%) e, em casos de esterilidade, os valores foram de 80 – 90%. Contudo, a proteção conferida pelos antioxidantes testados neste trabalho, impedindo a ocorrência do estresse oxidativo, não resultou em diferenças nos percentuais de gametas com fragmentação da cromatina (4,0 a 4,7%), que na realidade já eram bastante baixos.

Além disso, Lopes et al. (1998) observaram que o sêmen humano de baixa qualidade tem maior produção de ROS e é mais suscetível às lesões no DNA em consequência do estresse oxidativo, podendo afetar a fertilidade, ou seja, outro aspecto que pode ter favorecido a baixa ocorrência de fragmentação da cromatina neste trabalho, pois os ejaculados só eram usados se atendessem aos requisitos mínimos de qualidade espermática, com motilidade  $\geq 70\%$  e vigor  $\geq 3$ .

A CoQ10 na concentração de 40  $\mu\text{g/mL}$  mostrou-se eficaz na prevenção da fragmentação da cromatina na espécie humana, após 6 horas de incubação a temperatura ambiente, quando comparada ao grupo controle ( $15,0 \pm 1,7\%$  vs  $22,7 \pm 3,4\%$ , respectivamente;  $p < 0,01$ ; Talevi et al. 2013). Adicionada ao sêmen bovino pós-descongelamento, a CoQ10 também preveniu a fragmentação da cromatina, ao final de 5 horas de incubação a  $39^\circ\text{C}$ , com valores próximos a 20% no grupo tratado, enquanto o controle atingiu 34,5% (Gualtieri et al. 2014). Tal comportamento não foi observado neste experimento, pois o percentual de fragmentação da cromatina foi bastante baixo, portanto a

diferença entre metodologias e entre espécies, pode justificar esta divergência de resultados, uma vez que a 37°C o metabolismo espermático é máximo, assim como a atividade mitocondrial, resultando em alta geração de ROS. Desta forma, o DNA espermático está mais suscetível à fragmentação e a proteção dos antioxidantes pode ser mais bem avaliada.

Segundo Love et al. (2002), em equinos, não é observado aumento significativo na fragmentação do DNA até 46 horas de refrigeração, porém esta é significativamente maior quando o sêmen é armazenado a 37°C. De fato, amostras de sêmen equino submetidas à incubação a 37°C, após prévia refrigeração, exibiram aumento significativo no percentual de células lesadas após 1 hora, atingindo valores de 50% após 6 horas, e, às 48 horas 100% dos espermatozoides apresentaram danos (López-Fernández et al. 2007). Neste experimento as amostras retiradas do sistema de refrigeração eram mantidas somente por 10 minutos a 37°C até a realização da técnica do ATOL, o que resultou no baixo percentual de células exibindo fragmentação da cromatina.

Outro aspecto relevante refere-se à metodologia utilizada por Talevi et al. (2013) e Gualtieri et al. (2014). O grupo 3'-OH, gerado pela ação da enzima apurínica endonuclease 1 (APE1), serve como alvo para a transferase terminal empregada no ensaio TUNEL. No entanto, tal enzima é encontrada somente em células somáticas, sendo ausente em células germinativas, por isso sua utilização em espermatozoides vem sendo questionada (Gibb 2014).

As ROS também podem afetar a qualidade espermática através de alterações na função mitocondrial, tais como, a síntese de ATP, homeostase do cálcio e transporte de metabólitos (Baumber et al. 2000). A coloração com DAB é uma técnica citoquímica baseada na oxidação da 3,3' diaminobenzidina (DAB) pelo complexo citocromo C, com posterior deposição do composto sobre as mitocôndrias. Tal complexo está intimamente relacionado à respiração celular e ao metabolismo energético mitocondrial do espermatozoide (Hrudka 1987).

A proporção de células com alta atividade mitocondrial (DAB I) não diferiu entre os tratamentos, mas apresentou queda dos valores no decorrer do tempo de refrigeração, fato esperado pela própria senescência dos espermatozoides. Relatos semelhantes foram feitos na literatura, em que a adição de antioxidantes não enzimáticos ao sêmen equino não aumentou a atividade mitocondrial (Baumber et al. 2005; Franco et al. 2013). Um análogo hidrossolúvel do  $\alpha$ -TOH, o trolox, foi adicionado ao sêmen caprino por Soares et al. (2014). Os autores não observaram alteração da atividade mitocondrial, porém, foi constatada, pela microscopia

eletrônica de transmissão, maior preservação da bainha mitocondrial no grupo tratado, indicando um possível efeito benéfico.

No presente trabalho constatou-se que a adição de antioxidantes não enzimáticos, associados ou não, foi efetiva em reduzir o nível de lipoperoxidação do sêmen refrigerado. A forma reduzida da CoQ10, o ubiquinol, atua como um potente antioxidante em diversos sistemas biológicos, como lipoproteínas e membranas, protegendo-os contra a oxidação, inibindo a formação de hidroperóxidos e, conseqüentemente prevenindo a LPO (Alleva et al. 1997; Bentinger et al. 2007; Carocho e Ferreira 2013). Segundo Turunen et al. (2004), este cofator também pode neutralizar radicais lipídicos após sua formação, portanto, agindo na fase de iniciação e de propagação da LPO. Além disso, outra função importante da CoQ10 é a regeneração do  $\alpha$ -tocoferol a partir do radical  $\alpha$ -tocoferil (Crane e Navas 1997).

A vitamina E compreende um grupo de compostos antioxidantes lipossolúveis, encontrados em grande quantidade nos lipídeos das membranas biológicas. O  $\alpha$ -TOH é o mais potente e atua bloqueando a etapa de propagação da LPO dos PUFA's das membranas e lipoproteínas, doando seu hidrogênio fenólico para o radical peroxila, dando origem ao radical tocoferil, o qual é incapaz de manter a reação oxidativa em cadeia (Nordberg e Arnér 2001; Vasconcelos et al. 2007; Traber e Atkinson 2007; Andrade et al. 2010; Carocho e Ferreira 2013).

O grupo  $\alpha$ -TOH protegeu os espermatozoides contra os danos causados pelas ROS, proporcionando menores níveis de lipoperoxidação, quando comparado aos grupos controle e EtOH. Estes resultados estão de acordo com os relatados para equinos (Almeida e Ball 2005; Franco et al. 2013) e caprinos (Breininger et al. 2005), nos quais os autores observaram diminuição dos níveis de LPO, nos grupos tratados com  $\alpha$ -TOH. Yousefian et al. (2014), constataram que a associação da CoQ10 (1  $\mu$ M) com o  $\alpha$ -tocoferol (5 mM) mostrou-se mais eficaz na prevenção da LPO. Este mesmo resultado pode ser observado neste experimento, no qual o  $\alpha$ -TOH e a associação da CoQ10 +  $\alpha$ -TOH, proporcionaram os menores níveis de lipoperoxidação, sugerindo uma ação sinérgica entre estes antioxidantes, através da reciclagem do  $\alpha$ -tocoferil em  $\alpha$ -tocoferol.

Acredita-se que o etanol exerça efeitos deletérios sobre os espermatozoides (Brooks 1990). Neste experimento, esta substância foi utilizada como controle positivo do  $\alpha$ -tocoferol (Almeida e Ball 2005; Nasiri et al. 2012). Comparando-o ao controle negativo (C), observou-se que não houve diferença entre os tratamentos; no entanto, ao compará-lo com o  $\alpha$ -TOH,

constatou-se efeito protetor do antioxidante, com maior valor de motilidade total e menor nível LPO ( $p < 0,05$ ).

Os antioxidantes testados neste experimento apresentaram resultados promissores, no entanto, testes ainda devem ser desenvolvidos, principalmente, para o estabelecimento de doses e protocolos ideais, para que os mesmos possam ser utilizados em diluentes comerciais. Faz-se necessário testá-los no sêmen de garanhões sub-férteis, uma vez que a infertilidade masculina vem sendo atribuída aos elevados níveis de ROS, no sêmen de animais considerados “maus refrigeradores”, além de avaliados à criopreservação, processo no qual se têm um aumento da geração de ROS.

Diante do exposto conclui-se que a CoQ10 e o  $\alpha$ -TOH foram eficazes, durante a refrigeração do sêmen equino a 5°C por 72 horas, em melhorar a motilidade total e vigor espermáticos, bem como em diminuir a lipoperoxidação. Porém, mais estudos são necessários para se determinar as concentrações e protocolos mais indicados, em especial frente à suscetibilidade individual e a variação entre ejaculados.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos criadores que disponibilizaram seus animais para a execução da pesquisa, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

## REFERÊNCIAS

- Agarwal A, Said TM, 2003: Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod* **9**, 331-345.
- Agarwal A, Gupta S, Sikka S, 2006: The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology* **18**, 325-332.
- Aitken RJ, 1995: Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. *Reprod Fert Develop* **7**, 659-668.
- Alleva R, Scararmucci A, Mantero F, Bompadre S, Leoni L, Littarru GP, 1997: The protective role of ubiquinol-10 against formation of lipid hydroperoxides in human seminal fluid. *Mol Aspects Med* **18**, 221-228.
- Almeida A, Ball BA, 2005: Effect of  $\alpha$ -tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. *Anim Reprod Sci* **87**, 321-337.

- Amann RP, Graham JK, 2011: Spermatozoal function. In: McKinnon, AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD, Equine Reproduction. 2 ed. West Sussex: Wiley-Blackwell, cap.98, v.1. p.1053-1084.
- Andrade ER, Melo-Sterza FA, Seneda MM, Alfieri AA, 2010: Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. Rev Bras Reprod Anim **34**, 79-85.
- Aurich C, 2005: Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. Anim Reprod Sci **89**, 65-75.
- Aurich C, 2008: Recent advances in cooled-semen technology. Anim Reprod Sci **107**, 268-275.
- Aurich JE, Schonherr U, Hoppe H, Aurich C, 1997: Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. Theriogenology **48**,185-192.
- Aurich C, 2008: Recent advances in cooled-semen technology. Anim Reprod Sci **107**, 268-275.
- Ball BA, Medina V, Gravance CG, Baumber J, 2001: Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 °C. Theriogenology **56**, 577-569.
- Barrier-Battut I, Bonnet C, Giraudo A, Dubois C, Caillaud M, Vidament M, 2013: Removal of seminal plasma enhances membrane stability on fresh and cooled stallion spermatozoa. Reprod Domest Anim **48**, 64-71.
- Baumber J, Ball BA, Linfor JJ, 2005: Assessment of cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. Am J Vet Res **57**, 772-779.
- Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies-Morel MCG, 2000: The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. J Androl **21**, 895-902.
- Beletti ME, Costa LF, Viana MPA, 2004: Computational approach to characterization of bovine sperm chromatin alterations. Biotech Histochem **79**, 17-23.
- Bentinger M, Brismar K, Dallner G, 2007: The antioxidant role of coenzyme Q. Mitochondrion **7S**, S41-S50.
- Breining E, Beorlegui NB, O'Flaherty MC, Beconi MT, 2005: Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. Theriogenology **63**, 2126-2135.

- Brito LFC, Barth AD, Bilodeau-Goeseels S, Panich PL, Kastelic JP, 2003: Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. *Theriogenology* **60**, 1539–1551.
- Brooks DE, 1990: Acid-soluble phosphorus compounds in mammalian semen. *Biochem J* **118**, 851–857.
- Carocho M, Ferreira ICFR, 2013: A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol* **51**, 15-25.
- Casey PJ, Hillman RB, Robertson KR, Yudin AI, Liu IKM, Drobnis EZ, 1993: Validation of an acrosomal stain for equine sperm that differentiates between living and dead sperm. *J Androl*, **14**, 289-297.
- Cocchia N, Pasolini MP, Mancini R, Petrazzuolo O, Cristofaro I, Rosapane I, Sica A, Tortora G, Lorzio R, Paraggio G, Mancini A, 2011: Effect of SOD (superoxide dismutase) protein supplementation in semen extenders on motility, viability, acrosome status and ERK (extracellular signal-regulated kinase) protein phosphorylation of chilled stallion spermatozoa. *Theriogenology* **75**, 1201-1210.
- Crane FL, Navas P, 1997: The diversity of coenzyme Q function. *Mol Aspects Med* **18**, s1-s6.
- Evenson DP, Jost L, 2000: Sperm chromatin structure assay is useful for fertility assessment. *Method Cell Sci* **22**, 169-189.
- Farrás MC, Avanzi BR, Melo CM, Dell'Aqua JA, Papa, FO, 2008: Efeito de diferentes diluentes na manutenção das características do sêmen equino em dois sistemas de refrigeração passiva. *Ciênc Anim Bras* **9**, 693-699.
- Ferreira ALA, Matsubara LS, 1997: Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Assoc Med Bras* **43**, 61-68.
- Franco JSV, Chaveiro A, Góis A, Silva FM, 2013: Effects of  $\alpha$ -tocopherol and ascorbic acid on equine semen quality after cryopreservation. *J Equine Vet Sci* **33**, 787-793.
- Garner DL, Thomas CA, Joerg HW, Dejanertte JM, Marshall CE, 1997: Fluorometric assessments of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod* **57**, 1401-1406.
- Gharagozloo P, Aitken RJ, 2011: The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Hum Reprod* **26**, 1628-1640.

- Gibb Z, 2014: Emerging sperm assessments; from the lab to the clinic and back again. In: Proceeding of the Biennial Conference of the Association for Applied Animal Andrology, Newcastle, Australia. Disponível em: <<http://www.ivas.org>>. Acesso em: 20 de novembro de 2014.
- Gibb Z, Lambourne SR, Aitken RJ, 2014: The paradoxical relationship between stallion fertility and oxidative stress. *Biol Reprod* **91**, 1-10.
- Graham JK, 2011: Principles of cooled semen. In: McKinnon, AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD, *Equine Reproduction*. 2 ed. West Sussex: Wiley-Blackwell, cap.127, v.1. p.1308-1315.
- Gualtieri R, Barbato V, Fiorentino I, Braun S, Rizos D, Longobardi S, Talevi R, 2014: Treatment with zinc, d-aspartate, and coenzyme Q10 protects bull sperm against damage and improves their ability to support embryo development. *Theriogenology* **82**, 592-598.
- Harrison RAP, Vickers SE, 1990: Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J Reprod Fertil* **88**, 343-352.
- Hartwig FP, Lisboa FP, Hartwig FP, Monteiro GA, Maziero RRD, Freitas-Dell'Aqua CP, Alvarenga MA, Papa FO, Dell'Aqua Jr JA, 2014: Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: An alternative for bad cooler stallions. *Theriogenology* **81**, 340-346.
- Hrudka F, 1987: Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. *Int J Androl* **19**, 809-828.
- Januskauskas A, Rodriguez-Martinez H, 1995: Assessment of sperm viability by measurement of ATP, membrane integrity and motility in frozen/thawed bull semen. *Acta Vet Scand* **36**, 571-574.
- Johannisson A, Lundgren A, Humblot P, Morrell JM, 2014: Naturally and stimulated levels of reactive oxygen species in cooled stallion semen destined for artificial insemination. *Anim* **8**, 1706-1714.
- Kothari S, Thompson A, Agarwal A, Plesses SS, 2010: Free radicals: Their beneficial and detrimental effects on sperm functions. *Indian J Exp Biol* **48**, 425-435.
- Lewin A, Lavon H, 1997: The effect of coenzyme Q10 on sperm motility and function. *Mol Aspects Med* **18**, s213-s219.
- Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF, 1998: Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* **13**, 896-900.

- López-Fernández CF, Crespo F, Arroyo F, Fernández L, Arana P, Johnston SD, Gosálvez J, 2007: Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals II. The stallion. *Theriogenology* **68**, 1240-1250.
- Love CC, Thompson JA, Lowry VK, Varner DD, 2002: Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility. *Theriogenology* **57**, 1135-1142.
- Macías García B, Gonzáles Fernández L, Ortega Ferrusola C, Salazar-Sandoval C, Morillo Rodríguez a, Rodríguez Martínez H, Tapia JÁ, Morcuende D, Peña FJ, 2011: Membrane lipids of the stallion spermatozoon in relation to sperm quality and susceptibility to lipid peroxidation. *Reprod Domest Anim* **46**, 141-148.
- Maia MS, Bicudo SD, 2009: Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. *Rev Bras Reprod Anim* **33**, 183-193.
- Nasiri AH, Towhidi A, Zeinoaldini S, 2012: Combined effect of DHA and  $\alpha$ -tocopherol supplementation during bull semen cryopreservation on sperm characteristics and fatty acid composition. *First Int J Androl* **44**, 550-555.
- Newcombe JR, Cuervo-Arango J, 2011: The effect of time of insemination with fresh cooled transported semen and natural mating relative to ovulation on pregnancy and embryo loss rates in the mare. *Reprod Domest Anim* **46**, 678-681.
- Nichi M, Goovaerts IGF, Cortada CNM, Barnabe VH, De-Clercq JBP, Bols PEJ, 2007: Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on *in vitro* fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymis stored at 4 and 34 °C. *Theriogenology* **67**, 334-340.
- Nordberg J, Arnér ESJ, 2001: Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Bio Med* **31**, 1287-1312.
- Nunes DB, Zorzatto JR, Costa e Silva EV, Zúccari CESN, 2008. Efficiency of short-term storage of equine semen in a simple-design cooling system. *Anim Reprod Sci* **104**, 434-439.
- Patel SR, Sigman M, 2008: Antioxidant therapy in male infertility. *Urol Clin N Am* **35**, 319-330.
- Sampaio, IBM, 2007: Estatística aplicada à experimentação animal. **3.ed.** Belo Horizonte Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária, Belo Horizonte, 264p.
- SAS – Statistical Analysis System, 2001: SAS/STAT software, **Version 8.02**.
- Satorre MM, Breininger E, Beconi MT, Beorlegui NB, 2007:  $\alpha$ -Tocopherol modifies tyrosine phosphorylation and capacitation-like state of cryopreserved porcine sperm. *Theriogenology* **68**, 958-965.

- Soares AT, Silva SV, Batista AM, Almeida FC, Nunes JF, Peixoto CA, Guerra MMP 2014: Ultrastructure evaluation of goat spermatozoa after freezing in a skim milk-based extender with Trolox supplementation. *First Int J Androl* **doi: 10.1111/and.12279**, 1-7.
- Squires EL, Pickett BW, Graham JK, Vanderwall DK, McCue PM, Bruemmer JE, 1999: Cooled and Frozen Stallion Semen. *Anim Reprod Biotech Lab. Fort Collins, Bulletin* **9**, 1-38, 1999.
- Talevi R, Barbato V, Fiorentino I, Braun S, Longobardi S, Gualtieri R, 2013: Protective effects of in vitro treatment with zinc, d-aspartate and coenzyme Q10 on human sperm motility, lipid peroxidation and DNA fragmentation. *Reprod Bio Endocrinol* **11**, 1-10.
- Traber MG, Atkinson J, 2007: Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Bio Med* **43**, 4-15.
- Turunen M, Olsson J, Dallner G, 2004: Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim Biophys Acta* **1660**, 171-199.
- Varner DD, Gibb Z, Aitken RJ, 2014: Stallion fertility: A focus on the spermatozoon. *Equine Vet J* **47**, 16-24.
- Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT, 2007: Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quím Nova* **30**, 1323-1338.
- Yousefian I, Zare-Shahneh A, Mahdi Zhandi M, 2014: The effect of Coenzyme Q10 and  $\alpha$ -Tocopherol in skim milk-based extender for preservation of Caspian stallion. *J Equine Vet Sci* **34**, 949-954.