Marcilio Nichi

Sistemas de proteção enzimática e níveis de
peroxidação espontânea dos lipídios
seminais de touros zebuínos e taurinos
criados a campo na região de Dourados, MS

São Paulo
2003

Marcilio Nichi

**Sistemas de proteção enzimática e níveis de
peroxidação espontânea dos lipídios seminais de
touro zebuínos e taurinos criados a campo na
região de Dourados, MS**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo para a obtenção
do título de Mestre em Medicina
Veterinária.

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Renato Campanarut Barnabe

São Paulo
2003

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1217
FMVZ

Nichi, Marcílio

Sistemas de proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídios seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de Dourados, MS / Marcílio Nichi. – São Paulo : M. Nichi, 2003.
101 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2003.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Renato Campanarut Barnabe.

1. Radicais livres. 2. Sêmen animal. 3. Antioxidantes.
4. Bovinos. 5. Estresse. I. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do autor: NICHI, Marcilio

Título: Sistemas de proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídios
seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de Dourados, MS.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade de São
Paulo para a obtenção do título de Mestre em
Medicina Veterinária.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof: Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof: Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof: Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico,

Aos meus pais, Ademar e Leiko, que são tudo o que eu queria ser, por me proporcionarem tudo, como se eu fosse o melhor filho do mundo, mesmo que muitas vezes, eu não fizesse por merecer.

Ao meu irmão Marcelo, por me ajudar de todas as formas que um ser humano pode ajudar a outro e me ensinar o verdadeiro significado da palavra Irmão,

Ao meu irmão Maurício, pois mesmo com todas as dificuldades da vida sempre me proporcionou amizade, carinho e amor.

À minha cunhada Sílvia, pela amizade e carinho com que sempre me recebeu.

Ao meu sobrinho Vitor, que ele se mire no exemplo dos avós e dos pais.

Aos meus avós e antepassados, por olharem por mim, mesmo que eu não consiga enxergá-los.

À Deus, por me proporcionar tudo, principalmente os acontecimentos ruins, com os quais eu procuro aprender a ser uma pessoa melhor.

AGRADECIMENTOS

Para mim, torna-se muito difícil agradecer às pessoas que me ajudaram no meu trabalho ou que me ajudaram através da amizade, muitas combinando as duas coisas. Para todas estas pessoas, uma simples dedicatória é injusta. Mais injusto ainda para as pessoas que, por ventura, eu esqueça de citar. Mas cada uma sabe que meu agradecimento não se dá em forma de palavras e sim de atitudes. Cada uma sabe o quanto eu sou grato por me ajudar a fazer deste sonho, uma realidade. Um dia alguém me disse que amizade não se agradece, mas de qualquer forma, muito obrigado.

Ao Professor Renato Campanarut Barnabe e à Professora Valquiria Hyppolito Barnabe, meus mais sinceros e profundos agradecimentos, não só pela orientação, mas por me receberem como a um filho, sempre com palavras de carinho, confiança, respeito e afeto.

À Professora e amiga Carmen Neusa Martins Cortada, não só pela co-orientação, mas pela amizade, confiança, encorajamento sem os quais esta etapa seria impossível, e pelos quais não seria possível retribuir apenas com esta dedicatória.

À Doutora Roberta Mara Züge, não só por me apresentar ao mundo da pesquisa me proporcionado o prazer de trabalhar com o que gosto, mas pela amizade fraternal, carinho e confiança.

A amiga Luciana Keiko Hatamoto, pela ajuda pela qual serei eternamente grato.

À nossa equipe de coletas, viagens, risos, trabalho e amizade, Camen, Roberta, Ricardo, Graciana, Thiesa, Deny, Lucas e Júnior.

Aos amigos que fiz na vida acadêmica e que se transformaram em amigos que fiz para a vida toda, Ricardo, Luciana, Karina, Paola, Márcio, Ana Paula, Nélcio, Rogério, Graciana, Thiesa, Sobrinho, Andréa, Vinícius, Viviane, Carla, Eduardo, Regina, Thais, Gutinho, Cristina, Everton, Gabriela, Marcelo Marvin, Samira, Péricles, Edílson, Daniela.

À minhas vizinhas, amigas, colegas Kari e Paola, pela amizade e por cuidarem de mim.

À diretoria, Márcio, Snarf, Cabral, Nélcio e Edu.

Aos amigos de Mogi, Betão, Magnus, Pietro, Rogério, Ludmila, Letícia, Larissa, Edna, Beto, Mayra, Duzão, Leandro Batata, Carlos Eduardo (Charuto), Marcelus, Hélio, Juliana Bridi, Lúcia, Larissa, Miranda, Ique Mattos, Ique Amoedo, Vetoratto, Davi (Brutus), Marcelo Bridi, Márcio Panguá, Michel, Nanci, Nelsinho, Duzinho, Mariana, Lauro Lima, Fábio Silva, Alan.

A todos os professores do Departamento de Reprodução Animal, Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães, Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, Prof. Dr. José Antônio Visintin, Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira, Profa. Dra. Mayra Helena Ortiz D'Avila Assumpção, Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi, Prof. Dr. Mário Binelli, Prof. Dr. Ed

Hoffmann Madureira, Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda, Profa. Dra. Clair Motos de Oliveira, Prof. Dr. Wilson Gonçalves Vianna, Prof. Dr. Laudinor De Vuono.

Aos professores Wilson Roberto Fernandes, Prof Dr. Ângelo João Stopiglia, Prof. Dr. Luis Cláudio Lopes C. da Silva, Prf. Dr. Eduardo Harry Birgel Júnior, Prof. Dr. Fernando José Benesi, pela amizade.

À minha querida Dona Sívia.

Aos amigos e funcionários do Departamento de Reprodução Animal Daura, Miguel, Maria Amélia, Jocimar, Irailton, Luiz, Belau, Dona Eunice.

A todos os funcionários da biblioteca.

A todos funcionários da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no nome de seu diretor, Prof. Dr. Masao Iwasaki.

À CAPES, por proporcionar a bolsa, sem qual nada disso seria possível.

À Fundação de Amparo a Pesquisa (FAPESP), por financiar este experimento.

NICHI, M. **Sistemas de proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídios seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de Dourados, M.S.** [Enzymatic protection systems and spontaneous lipid peroxidation levels in semen of Indian and European bulls kept under extensive breeding in the Dourados region, in Mato Grosso do Sul State]. 2003. 101 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

A resistência de bovinos *Bos taurus taurus* a ambientes tropicais é menor quando comparada com a de *Bos taurus indicus*. Essa característica influencia os aspectos reprodutivos e vem sendo amplamente descrita na literatura. No que diz respeito aos touros, esta influência torna-se ainda mais significativa, visto que uma menor fertilidade destes impõe enorme impacto na produção animal. Vários são os estudos que comprovam o efeito negativo do estresse térmico sobre os parâmetros seminais de touros europeus provocando diminuição da fertilidade, porém a patogenia deste quadro não está confirmada. Uma hipótese para esta menor fertilidade seria um maior nível de estresse oxidativo nos touros europeus, no qual haveria um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs) e os níveis de proteção antioxidante. Para testar esta hipótese, foram utilizados 16 touros Simental (*Bos taurus taurus*) e 11 touros Nelore (*Bos taurus indicus*), criados a campo, na região de Dourados, Mato Grosso do Sul, submetidos a duas coletas anuais, durante o verão e inverno, no período de dois anos consecutivos. As amostras foram analisadas através da análise espermática padrão, dos níveis das enzimas antioxidantes, catalase e superóxido dismutase (SOD), e dos níveis de malondialdeído (MDA), produto da peroxidação lipídica, que foi utilizado como índice de estresse oxidativo. Os dados foram analisados pela análise de variância ONEWAY, levando em conta as classes raça (Nelore e Simental) e estação do ano (verão e inverno), através do programa SAS for Windows. As variáveis defeitos menores, defeitos totais e motilidade não apresentaram diferenças quanto a raça ou estação do ano. Observou-se efeito de estação do ano sobre as variáveis defeitos maiores ($20,32 \pm 15,30\%$ e $12,17 \pm 12,27\%$, verão e inverno respectivamente; $p=0,02$) e MDA ($842,66 \pm 527,98$ e $419,30 \pm 434,14$ ng/ml, verão e inverno respectivamente; $p=0,006$), apenas no sêmen dos touros de raça Simental. As concentrações das enzimas antioxidantes SOD e catalase, não diferiram entre as raças e tampouco entre as estações do ano. Observou-se correlação entre MDA e formas anormais de cabeça ($r=0,39$, $p=0,0035$) e entre SOD e defeitos primários ($r= - 0,31$, $p=0,0075$). Os resultados obtidos sugerem que houve um maior nível de estresse oxidativo nos animais de origem européia criados a campo em clima tropical em relação aos animais de origem indiana, provavelmente relacionado a uma produção excessiva de EROs sem a devida compensação antioxidante.

Palavras-chave: Radicais livres. Sêmen animal. Antioxidantes. Bovinos. Estresse.

NICHI, M. **Enzymatic protection systems and spontaneous lipid peroxidation levels in semen of Indian and European bulls kept under extensive breeding in the Dourados region, in Mato Grosso do Sul State.** [Sistemas de proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídios seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de Dourados, M.S]. 2003. 101 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

Resistance to tropical environments is lower in *Bos taurus taurus* than in *Bos taurus indicus* cattle. This trait influences reproductive aspects, and is greatly discussed in publications worldwide. This negative influence is much more significant in bulls, since lower fertility in them highly impacts animal production. There are many studies demonstrating that exposure of European bulls to heat stress will negatively affect their seminal parameters, leading ultimately to lower fertility rates, but the pathogenic pathway has not been clarified. One hypothesis is that this lower fertility is due to higher levels of oxidative damage in these bulls, in which there would be an imbalance between reactive oxygen species (ROS) production and antioxidant capacity. In order to test this hypothesis, 16 Simmental bulls (*Bos taurus taurus*) and 11 Nelore bulls (*Bos taurus indicus*) kept under extensive breeding in the Dourados region, in Mato Grosso do Sul state were used. Semen collection occurred twice a year, during summer and winter, for a two year period. Samples were submitted to standard semen analysis and the levels of the antioxidant enzymes catalase and superoxide dismutase (SOD) dismutase were measured. To evaluate oxidative damage to the cells the levels of the lipid peroxidation product malondialdehyde (MDA) were measured. Data were analyzed for breed (Nelore or Simmental) and season (summer or winter) by the ONEWAY analysis of variance, using the SAS for Windows. Minor defects, total defects and motility did not differ in breed or in season. Season showed an effect on major defects ($20.32 \pm 15.30\%$ and $12.17 \pm 12.27\%$, summer and winter respectively; $p=0.02$) and MDA (842.66 ± 527.98 and 419.30 ± 434.14 ng/mL, summer and winter respectively; $p=0.006$), only in the Simmental animals. SOD and catalase levels did not differ between breeds or seasons. Correlations were observed between MDA and sperm head defects ($r=0.39$, $p=0.0035$) and between SOD and primary defects ($r= -0.31$, $p=0.0075$). Results suggest a higher level of oxidative stress in European bulls raised in field conditions, when compared to Indian bulls under the same conditions, and this is probably due to a higher ROS production, without a concomitant increase in antioxidant levels.

Key words: Free radical. Semen. Antioxidants. Bovine. Stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Esquema 1	Formação das espécies reativas de oxigênio (EROs), modificado de Chabot et al., 1998.....	31
Gráfico 1	Dados meteorológicos (temperatura média, máxima e mínima) da região de Dourados, MS – 01/04/2000 – 02/02/2002.....	53
Gráfico 2	Umidade relativa (%) e incidência pluviométrica (mm de chuva) da região de Dourados, MS – 01/04/2000 – 02/02/2002.....	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Efeito das estações do ano e das raças na motilidade retilínea progressiva, das amostras seminais de touros das raças Nelore e Simental, criados a campo, coletadas em invernos e verões consecutivos - Dourados - Mato Grosso do Sul - 2000-2002.....	63
Tabela 2	Efeito das estações do ano em função das raças na motilidade retilínea progressiva, das amostras seminais de touros das raças Nelore e Simental, criados a campo, coletadas em invernos e verões consecutivos. - Dourados - Mato Grosso do Sul - 2000-2002.....	63
Tabela 3	Efeito das raças em função das estações do ano na motilidade retilínea progressiva, das amostras seminais de touros das raças Nelore e Simental, criados a campo, coletadas em invernos e verões consecutivos. - Dourados - Mato Grosso do Sul - 2000-2002.....	63
Tabela 4	Efeito das raças e estações do ano na porcentagem de defeitos espermáticos maiores, menores e totais, de touros das raças Nelore e Simental, criados a campo, a partir de amostras coletadas em invernos e verões consecutivos - Dourados - Mato Grosso do Sul - 2000/2002.....	67
Tabela 5	Efeito das estações do ano em função das raças na porcentagem de defeitos espermáticos maiores, menores e totais, de touros das raças Nelore e Simental, criados a campo, a partir de amostras coletadas em invernos e verões consecutivos. - Dourados - Mato Grosso do Sul - 2000-2002.....	67
Tabela 6:	Efeito da raça em função das estações do ano na porcentagem de defeitos espermáticos maiores, menores e totais, de touros das raças Nelore e Simental, criados a campo, a partir de amostras coletadas em invernos e verões consecutivos - Dourados - Mato Grosso do Sul - 2000-2002.....	68
Tabela 7	Efeito das raças e das estações do ano nas concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), das amostras seminais de touros das raças Nelore e Simental, criados a campo, coletadas em invernos e verões consecutivos - Dourados - Mato Grosso do Sul - 2000-2002.....	71
Tabela 8	Efeito das estações do ano, em função das raças, nas concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), das amostras seminais de touros das raças Nelore e Simental, criados a campo, coletadas em invernos e verões consecutivos - Dourados - Mato Grosso do Sul - 2000-2002.....	71
Tabela 9	Efeito das raças, em função das estações do ano, nas concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), das amostras seminais de touros das raças Nelore e Simental, criados a campo, coletadas em invernos e verões consecutivos - Dourados - Mato Grosso do Sul - 2000-2002.....	71

- Tabela 10 Efeito das raças e das estações do ano nos níveis de atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), das amostras seminais de touros das raças Nelore e Simental, criados a campo, coletadas em invernos e verões consecutivos - Dourados - Mato Grosso do Sul - 2000-2002..... 77
- Tabela 11 Efeito das estações do ano em função das raças nos níveis de atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), das amostras seminais de touros das raças Nelore e Simental, criados a campo, coletadas em invernos e verões consecutivos - Dourados - Mato Grosso do Sul - 2000-2002..... 77
- Tabela 12 Efeito das raças em função das estações do ano nos níveis de atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), das amostras seminais de touros das raças Nelore e Simental, criados a campo, coletadas em invernos e verões consecutivos - Dourados - Mato Grosso do Sul - 2000-2002..... 77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABP	proteína ligadora de andrógeno
AGCC	ácidos graxos que possuem mais de 2 ligações duplas carbono-carbono
ATA	capacidade antioxidante total
ATP	adenosina tri fosfato
Cu^+	íon cobre monovalente
Cu^{2+}	íon cobre bivalente
CuZn-SOD	superóxido dismutase do citosol
DNA	ácido desoxiribonucleico
EC-SOD	superóxido dismutase extracelular
EOP	estresse oxidativo positivo
ERO	espécie reativa ao oxigênio
F1	primeira geração de produtos oriundos de cruzamentos de duas raças diferentes
FAO	Food and Agriculture Organization
Fe^{2+}	íon ferro bi-valente
Fe^{3+}	íon ferro tri-valente
GPx	glutathione peroxidase
GPx1	glutathione peroxidase tipo 1
GPx2	glutathione peroxidase tipo 2
GPx3	glutathione peroxidase tipo 3
GPx4	glutathione peroxidase tipo 4
GRD	glutathione reductase

GSH	glutathiona reduzida
GSSG	glutathiona oxidada
H ₂ O	molécula de água
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LH	hormônio luteinizante
MDA	malondialdeído
Mn-SOD	superóxido dismutase mitocondrial
MRP	movimento retilíneo e progressivo
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NO	óxido nítrico
O ₂	molécula de oxigênio
O ₂ ⁻	ânion superóxido
OH ⁻	radical hidroxila
OONO ⁻	peroxinitrito
p53	gene de supressão tumoral
PIB	produto interno bruto
SOD	superóxido dismutase
TBA	ácido 2-tiobarbitúrico
TBARs	substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
vs.	versus

LISTA DE SIMBOLOS

%	porcentagem
<	menor que
=	igual
>	maior que
±	mais ou menos
μL	microlitro
μM	micro molar
cm	centímetro
g	força centrípeta
Kda	quilo Daltom
Log ₁₀	logarítimo na base 10
M	molar
mL	mililitro
mm	milímetros
N	normal
ng	nanograma
nm	nanometro
°	graus
°C	graus Celsius
p	nível de significância
pH	potencial hidrogênio iônico
r	coeficiente de correlação de Pearson

R^2 coeficiente de regressão

U unidades

α alfa

β beta

Δ Variação

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	HIPÓTESE.....	19
3	OBJETIVOS.....	20
4	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
4.1	O USO DE CRUZAMENTOS NA PECUÁRIA COMO ALTERNATIVA PRODUTIVA.....	21
4.1.1	<i>Produtividade vs. Estresse Térmico de Animais Puros e Cruzados.....</i>	23
4.2	ESTRESSE TÉRMICO E PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE MACHOS.....	25
4.3	VARICOCELE E ESTRESSE TÉRMICO.....	28
4.4	ESTRESSE OXIDATIVO.....	30
4.4.1	<i>Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)</i>	30
4.4.1.1	<i>Ânion superóxido (O_2^-).....</i>	31
4.4.1.2	<i>Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)</i>	32
4.4.1.3	<i>Radical hidroxila (-OH)</i>	33
4.4.1.4	<i>Ânion óxido nítrico (NO)</i>	33
4.4.2	<i>EROs vs.Espermatozóide.....</i>	34
4.4.3	<i>Mecanismos de Proteção Antioxidante no Sêmen.....</i>	39
4.4.3.1	<i>Superóxido dismutases (SOD)</i>	40
4.4.3.2	<i>Catalase.....</i>	42
4.4.3.3	<i>Glutathione peroxidase (GPx) / Glutathione reductase (GRD)</i>	42
4.4.3.4	<i>Antioxidantes seminais e fertilidade.....</i>	44
4.4.4	<i>Avaliação do Estresse Oxidativo.....</i>	46
4.4.5	<i>Estresse Oxidativo em Touros.....</i>	50

5	MATERIAL E MÉTODO	53
5.1	LOCAL.....	53
5.2	ANIMAIS EXPERIMENTAIS E MANEJO.....	54
5.3	PERÍODO EXPERIMENTAL.....	55
5.4	COLETA DE SÊMEN.....	55
5.5	ANÁLISE DO SÊMEN.....	55
5.6	PROVAS BIOQUÍMICAS.....	56
5.6.1	<i>Processamento Inicial das Amostras</i>	57
5.6.2	<i>Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico – TBARs</i>	57
5.6.3	<i>Atividade das Enzimas Antioxidantes</i>	58
5.6.3.1	<i>Catalase (E.C. 1. 11. 1. 6)</i>	59
5.6.3.1	<i>Superóxido dismutase (SOD) (E.C. 1. 15. 1. 1)</i>	59
5.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
6.1	MOTILIDADE RETILÍNEA E PROGRESSIVA (MRP).....	63
6.2	MORFOLOGIA ESPERMÁTICA.....	67
6.3	SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS).....	70
6.4	NÍVEIS DE ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS.....	75
6.4.1	<i>Catalase</i>	75
6.4.2	<i>Superóxido dismutase (SOD)</i>	76
6.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	81
7	CONCLUSÕES	85
	REFERÊNCIAS	87

1 INTRODUÇÃO

A pecuária de corte é responsável por cerca de 13,5% do Produto Interno Bruto (PIB) do Brasil, sendo a região dos cerrados do Brasil Central o principal produtor de gado de corte, correspondendo a 50% do efetivo do rebanho bovino brasileiro (CNA, 2002; EMBRAPA, 2001). Esta região apresenta clima tropical quente úmido com temperatura mínima em torno de 10° C, máxima de 35°C e temperatura média de 20 a 24°C. Em climas como o apresentado nesta região, bovinos de origem européia (*Bos taurus taurus*), utilizados em cruzamentos industriais, apresentam menores índices de fertilidade.

O cruzamento industrial, visa incorporar nos animais provenientes destes cruzamentos, características como maior precocidade, maior potencial de crescimento, melhor acabamento de carcaça dos animais *Bos taurus taurus* e maior adaptabilidade, boa habilidade materna, e maior resistência a parasitos dos animais *Bos taurus indicus*. Visto que nos cruzamentos industriais utilizados no Brasil, a grande maioria dos criadores ainda utiliza a monta natural, o impacto da menor fertilidade dos touros europeus é extremamente grande

A menor fertilidade dos touros de origem européia em condições tropicais vem sendo bastante estudada, porém, as causas da menor resistência em relação aos animais *Bos taurus indicus*, ainda não foram completamente desvendadas.

Uma hipótese para explicar a menor fertilidade dos touros europeus em relação aos zebuínos submetidos a condições tropicais, seria um maior índice de estresse oxidativo em nível testicular.

O estresse oxidativo é definido como um acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) que causam danos à estrutura das biomoléculas DNA, lipídios, carboidratos e proteínas, além de outros componentes celulares, e em humanos, foi identificado como causa

de infertilidade em várias pesquisas. Para evitar o ataque destas EROs, foram identificadas em sêmen humano, enzimas antioxidantes (superóxido dismutase - SOD; catalase e glutathione peroxidase/reductase), bem como outras substâncias com atividades semelhantes tais como a albumina, a glutathione, o piruvato, a taurina e hipotaurina e as vitaminas E e C (DE LAMIRANDE et al., 1997). No entanto, os espermatozoides por si próprios possuem apenas uma capacidade limitada de resistir ao estresse oxidativo, sendo altamente dependentes das propriedades de varredura do líquido seminal. Isto porque os sistemas de proteção enzimática são principalmente de origem citoplasmática e, como os espermatozoides possuem apenas uma pequena quantidade de citoplasma em sua porção intermédia, isto não é suficiente para que toda a sua membrana fique protegida (AITKEN, 1994). Desta forma, a falta de citoplasma e a presença de grandes quantidades de ácidos graxos insaturados na membrana plasmática dos espermatozoides tornam-nos particularmente susceptíveis ao estresse oxidativo.

Sendo assim, a menor fertilidade dos touros *Bos taurus taurus* em relação aos *Bos taurus indicus* em regiões tropicais, poderia ser explicada por uma maior produção de EROs e/ou por uma deficiência nos mecanismos de proteção antioxidante, causados pelas altas temperaturas observadas nestas regiões. Isto levaria a danos em testículos e nas células espermáticas e conseqüente diminuição da fertilidade.

2 HIPÓTESE

A hipótese central deste experimento é a de que touros não adaptados à ambientes tropicais (*Bos taurus taurus*), quando submetidos à temperaturas mais altas, apresentariam uma maior índice de estresse oxidativo seminal, por uma maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e/ou menor quantidade e atividade de sistemas antioxidantes, em relação à touros adaptados (*Bos taurus indicus*).

3 OBJETIVO

O objetivo do presente experimento foi verificar e quantificar os níveis de estresse oxidativo em amostras seminais de touros zebuínos e taurinos coletados no inverno e verão, por meio da dosagem de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), índice de peroxidação lipídica, e da quantificação da atividade de enzimas antioxidantes, correlacionando os resultados com dados referentes à análise espermática padrão (motilidade retilínea progressiva e anormalidade espermáticas).

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 O USO DE CRUZAMENTOS NA PECUÁRIA.

A cadeia produtiva da carne bovina no Brasil se caracteriza por uma alta diversidade de raças, de sistemas de criação, de condições sanitárias de abate e de formas de comercialização, bem como por uma alta descoordenação nas relações entre criadores, frigoríficos, atacadistas e varejistas. Apesar do quadro de atraso, estão acontecendo, em toda a cadeia de carne bovina, iniciativas modernizantes, que vêm se processando de forma desigual, porém com sinais de ser uma tendência irreversível. A diminuição dos componentes especulativos e patrimoniais na criação e comercialização de gado de corte, associada à pressão competitiva da carne de frango e das importações, tem forçado os produtores a adotar técnicas mais produtivas, como a rotatividade dos pastos e confinamento na entressafra, a integração pecuária-agricultura dentro das propriedades e os cruzamentos industriais, principalmente da raça zebuínas com raças européias.

A rotatividade dos pastos e confinamento na entressafra, assim como a integração pecuária-agricultura dentro das propriedades, demandam investimentos que, para os padrões brasileiros, limitam bastante sua utilização. Já o cruzamento industrial, tem se mostrado mais viável e vem sendo empregado por muitos criadores principalmente nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (SIFFERT FILHO; FAVERET FILHO, 1998).

Também chamado de cruzamento terminal, o cruzamento industrial possibilita o uso máximo da heterose. Além disto, viabiliza grande flexibilidade na escolha da raça terminal, o que garante rápidos ajustes a demandas de mercado ou a imposições do sistema de produção. É um esquema vantajoso para produção de animais a serem terminados em pastagens de boa

qualidade ou em confinamento, uma vez que este cruzamento resulta em animais que apresentam altas taxas de ganho de peso e altos pesos à terminação.

Segundo Porto et al. (1994), a heterose é definida como sendo a diferença entre a média da característica avaliada (fenótipo) nos indivíduos oriundos do cruzamento (F1), e a média desta mesma característica medida nos pais. A teoria que suporta a existência do efeito heterótico define que só haverá heterose quando houver diferença em frequência gênica entre as raças envolvidas no cruzamento e o efeito de dominância entre alelos não for zero. Se qualquer destas situações deixar de existir, a heterose será nula. Isto pode ser melhor entendido se considerarmos que as raças permaneceram geneticamente isoladas durante o processo de formação, sendo submetidas à pressões de seleção variáveis, tanto artificial, quanto natural. Este processo resultou em consangüinidade, que, juntamente com a flutuação aleatória na frequência gênica, contribuiu para a fixação de alguns homozigotos. Estes homozigotos tanto podem ser de genes com efeitos deletérios para o crescimento, fertilidade, conversão alimentar, qualidade de carne e carcaça (BURROW, 1998), quanto de genes cuja combinação heterozigótica produz resultados favoráveis. Assim, parece muito pouco provável que as diferentes raças tenham tido os mesmos alelos indesejáveis fixados na forma homozigótica. Isto será tanto mais verdade quanto mais distantes na origem e mais separadas espacialmente forem as raças. Desta forma, cruzando-se raças diferentes, as progênes terão os efeitos deletérios dos genes recessivos encobertos pelos genes dominantes e maior taxa de heterozigose (EUCLIDES FILHO, 1996).

Resultados experimentais com gado de corte têm possibilitado a conclusão de que a heterose existe em níveis variáveis dependendo da característica, e que é maior quando o cruzamento envolve raças zebuínas com européias. Portanto, promovendo-se cruzamentos industriais está-se utilizando ou procurando utilizar os benefícios da heterose que, como mencionado anteriormente, combina, nos produtos, características desejáveis das raças

envolvidas. Assim, produtos de cruzamentos *Bos taurus* (*Bos taurus*) com *Bos indicus* (*Bos indicus*) incorporam, relativo ao *Bos taurus*, vantagens como maior precocidade, maior potencial de crescimento, melhor acabamento de carcaça; e com relação ao *Bos indicus*, maior adaptabilidade, boa habilidade materna, e maior resistência a parasitos, características estas que as raças puras de ambas espécies não apresentam em conjunto (ARTHUR et al., 1999; CARTWRIGHT, 1955; KAHİ et al., 2000; TEODORO et al., 1996).

4.1.1 Produtividade vs. Estresse Térmico de Animais Puros e Cruzados

Cartwright (1955), verificou que produtos de cruzamento *Bos taurus* X *Bos indicus* apresentaram maior ganho de peso do que os animais puros *Bos taurus* e *Bos indicus* quando submetidos a altas temperaturas em câmara climática.

Teodoro et al. (1996), verificaram que fêmeas F1 do cruzamento entre *Bos taurus* e *Bos indicus*, em ambientes e manejo desfavoráveis, produziram mais leite que os animais puros, sendo que houve uma interação entre raça e ambiente, isto é, em ambientes e manejos adequados, os animais puros de origem européia produziram mais leite que os cruzados.

Arthur et al. (1999), comprovaram o efeito da heterose no cruzamento entre *Bos taurus* X *Bos indicus*, assim como a influência do ambiente no efeito heterótico.

Kahi et al. (2000), verificaram que vacas provenientes deste tipo de cruzamento apresentaram, em geral, melhor performance econômica na produção de leite quando comparadas com vacas puras, em regiões tropicais.

Os animais de origem zebuína (*Bos indicus*) se adaptam melhor às condições tropicais, sendo mais resistentes ao estresse térmico quando comparados aos de origem européia (*Bos taurus*) nestas mesmas condições, pois os zebuínos possuem uma menor conformação, maior

relação superfície de pele/tamanho corporal, mais glândulas sudoríparas e menor termogênese (BRITO et al., 2002; CHEMINEAU, 1994; TURNER, 1980).

Vários autores verificaram os efeitos do ambiente nas características produtivas e reprodutivas de animais de origem européia e zebuína, sendo estes últimos mais resistentes aos efeitos nocivos de altas temperaturas (CARTWRIGHT, 1955; FINCH, 1984; ROCHA et al., 1998).

Em um experimento realizado por Cartwright (1955), bovinos *Bos indicus* e *Bos taurus* foram submetidos à altas temperaturas em câmara climática, sendo que os animais *Bos indicus* apresentaram melhor performance no que diz respeito a respostas fisiológicas (menor temperatura corporal, menos movimentos respiratórios, menos batimentos cardíacos).

Rocha et al. (1998), verificaram que altas temperatura e umidade ambientes resultaram em um acentuado declínio na qualidade de oócitos recuperados de vacas *Bos taurus*, assim como diminuíram consideravelmente o desenvolvimento destes oócitos. Em contraste, uma alta porcentagem de oócitos recuperados de vacas *Bos indicus* exibiram morfologia normal, gerando uma alta porcentagem de blastocistos, independente da estação do ano.

Finch (1984), verificou que raças de ruminantes de origem indiana, em condições tropicais e subtropicais, em geral, possuem melhor performance que seus correlatos de zonas temperadas em termos de sobrevivência, reprodução e expressão de seu potencial genético para crescimento e produção leiteira.

Visto que, segundo a Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA, 2001) foram comercializadas, no Brasil em 2001, 3.431.808 de sêmen de touros de corte; e o rebanho brasileiro de bovinos de corte está em torno de 115.000.000 (FAO, 2001), pode-se concluir que a inseminação artificial é pouco utilizada. Segundo o censo agropecuário de 1995-1996 (IBGE, 1998) cerca de 5% do rebanho bovino brasileiro é inseminado. Sendo assim, para que o cruzamento industrial seja empregado no atual cenário brasileiro, é

necessária a presença de um touro de origem européia que, como dito anteriormente, é bastante susceptível às condições ambientais tropicais como: elevadas temperaturas e alto desafio de ecto e endoparasitos (WAMBURA et al., 1998).

Os efeitos deletérios das condições ambientais, em regiões tropicais, sobre o aspecto reprodutivo, tornam-se ainda mais relevantes no que diz respeito aos touros. Quando uma vaca falha ao reproduzir-se por qualquer razão, perde-se um bezerro. Quando um touro falha, há uma perda potencial de 25 a 50 bezerros para cada 100 vacas (CARRILO, 1988).

4.2 ESTRESSE TÉRMICO E PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE MACHOS

O efeito das condições ambientais tropicais, influenciando diferentemente os aspectos reprodutivos de touros de origem européia e touros de origem indiana, foi verificado por vários autores.

Johnston et al. (1963), verificaram que touros europeus de leite (Holandês E Pardo Suíço) apresentaram pior qualidade espermática (menor motilidade, concentração e número total de espermatozóides e maior taxa de anormalidades espermáticas) do que touros cruzados Holandês ou Pardo Suíço X Red Shindi, quando submetidos à câmara climática (40°C), sendo que os touros cruzados também apresentaram recuperação da qualidade espermática em maior grau e velocidade após o período de estresse térmico.

Fields et al. (1979), verificaram que touros *Bos taurus* de corte (Hereford e Angus), apresentaram um declínio mais acentuado na qualidade espermática (volume, motilidade, concentração) nos meses mais quentes quando comparados a touros de origem indiana ou touros europeus de raças adaptadas ao calor (Santa Gertrudes, Brahman).

Kumi-Dianka et al. (1981), obtiveram resultados que sugeriram que o estresse térmico nos trópicos levou a efeitos adversos na espermatogênese apenas nos touros de raças européias. Além disso, os touros mais velhos (a partir de 7,5 anos) apresentaram quadros de degeneração testicular com menor produção espermática e sêmen de pior qualidade (menor motilidade e concentração e maior porcentagem de anormalidades na morfologia espermática), sendo este efeito mais acentuado nas raças européias.

Meyerhoeffer et al. (1985), submeteram touros Angus (*Bos taurus*) a temperaturas em torno de 35°C em câmara climática, sendo que houve diminuição de motilidade e aumento da porcentagem defeitos de acrossomo duas semanas após o início do tratamento, quando comparado aos touros do grupo controle.

Parkinson (1987), verificou uma variação sazonal na qualidade espermática em touros Holandeses (*Bos taurus*), com a qualidade espermática diminuindo nos meses mais quentes do ano (28°C). Da mesma forma, Ohashi et al. (1988), verificaram que touros *Bos indicus* (Nelore) e cruzados *Bos indicus* X *Bos taurus* (Pitangueiras, Nelore X Chianina), criados na região amazônica (temperaturas em torno de $26 \pm 10^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar de 85%), apresentaram menor índice de degeneração testicular quando comparados a touros *Bos taurus* (Holandês Preto e Branco) criados nesta mesma região.

Vogler et al. (1991), verificaram que o sêmen de touros holandeses submetidos a insulação escrotal apresentou maior porcentagem de defeitos de cabeça (cabeças soltas, piriformes, vacúolos) e diminuição de motilidade, cerca de 12 dias após a insulação, quando comparado aos níveis basais obtidos um dia antes da insulação. Neste mesmo experimento, a qualidade do sêmen (motilidade, viabilidade e integridade acrossômica) pós-descongelamento menor no período entre os dias 3 e 9 pós insulação, quando comparada com a dos períodos antes da insulação e 12 a 21 dias após a insulação. Os autores sugerem que o estresse térmico provocou a diminuição da qualidade do sêmen criopreservado, mesmo antes do aparecimento

de anormalidades espermáticas, bem como da viabilidade espermática; provavelmente devido à vulnerabilidade dos espermatozóides testiculares à elevadas temperaturas.

Wildeus e Hammond (1993), verificaram menor função reprodutiva em touros Holandeses (*Bos taurus*) quando comparados a touros Senepol (*Bos taurus* adaptados) em uma região semi-árida (temperaturas médias anuais de 22,2 a 32,2°C, com picos de 36 a 39°C), sendo a quantidade de espermatozóides (volume e concentração) mais afetada do que a qualidade espermática (motilidade e morfologia).

Söderquist et al. (1996), observaram que houve efeito sazonal na morfologia espermática, com a ocorrência de maior porcentagem de anormalidades de cabeça e defeitos totais nos meses de verão em touros de leite (*Bos taurus*) em centrais de inseminação artificial na Suécia.

Chacón et al. (1999), classificaram touros *Bos taurus* e *Bos indicus* criados na Costa Rica (29 a 33°C de temperatura média anual) como saudáveis ou não saudáveis reprodutivamente através de características tais como, perímetro escrotal, morfologia espermática, consistência testicular e histórico reprodutivo. A porcentagem de touros não saudáveis para reprodução foi estatisticamente menor para os touros *Bos indicus*, quando comparado com os touros *Bos taurus* (29% e 41% respectivamente, $p < 0,01$).

Vários foram os trabalhos realizados para verificar os efeitos do estresse térmico nas características seminais de bovinos, porém, poucos são os que tentaram identificar a etiologia dos danos causados pelo aumento de temperatura nas células espermáticas. Para o normal funcionamento do testículo bovino, a temperatura escrotal interna deve estar em torno de 33 a 34,5 °C (WILDEUS; ENTWISTLE, 1983; BARTH; BOWMAN, 1994), sendo que mesmo pequenos aumentos na temperatura testicular, ainda que menores que a temperatura corporal, causam um acentuado distúrbio na espermatogênese, configurando então, um quadro de estresse térmico testicular.

Uma explicação para a influência da temperatura nos testículos de mamíferos seria a de que os mesmos normalmente operariam no limite da hipóxia (BARTH; BOWMAN, 1994). Nos touros, a artéria testicular, se dispõe de forma espiral no cone vascular sendo um componente do plexo pampiniforme. O espiralamento promove um mecanismo de troca de calor contracorrente e uma diminuição na velocidade da corrente sanguínea, de forma que o pulso fica bastante obliterado no suprimento arterial do tecido testicular (WAITES; SETCHELL, 1964). Aumentos na temperatura local resultam em um aumento na taxa metabólica e um correspondente aumento da demanda de oxigênio sem a elevação da circulação sanguínea, provocando a hipóxia do tecido testicular.

4.3 Varicocele e Estresse Térmico

Estudos em medicina reprodutiva humana utilizam modelos experimentais animais, tais como caninos, suínos, ovinos, caprinos e animais de laboratório, para a posterior aplicação em humanos. Já nas pesquisas em biotecnologia aplicada à reprodução de animais como bovinos e eqüinos, muitos pesquisadores utilizam hipóteses e conclusões obtidas na área de reprodução humana. Um exemplo de hipóteses e conclusões obtidas em humanos é a varicocele, utilizada para o estudo do estresse térmico em animais.

A varicocele é um distúrbio reprodutivo descrito em humanos que é causado por uma dilatação anormal das veias testiculares dentro do plexo pampiniforme, causando prejuízos na termoregulação testicular e levando a um quadro de estresse térmico (NOSKE; WEIDNER, 1999), devido ao refluxo do sangue quente abdominal através de válvulas inábeis das veias espermáticas (JAROW, 2001).

Nos pacientes com varicocele ocorre freqüentemente uma diminuição da fertilidade. Vários estudos relacionam esta reduzida fertilidade com a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e, conseqüentemente, com o estresse oxidativo positivo (EOP) (AITKEN; CLARKSON, 1987a; HONIG et al., 1993; LENZI et al., 1993 e 1994; MAZZILLI et al., 1994).

Em dois estudos com homens portadores de varicocele, Lenzi et al. (1993 e 1994), verificaram que a terapia com antioxidantes (glutathione peroxidase) melhorou os aspectos espermáticos (aumento da motilidade e diminuição das alterações morfológicas) no grupo tratado em relação aos pacientes tratados com placebo, o que comprova a influência das EROs nos parâmetros seminais destes indivíduos.

Sharma et al. e Hendin et al., ambos em 1999, verificaram maior nível de EROs ($p=0,02$ e $p=0,02$, respectivamente) e menor nível de antioxidantes ($p=0,0002$ e $p=0,02$, respectivamente) em homens com varicocele quando comparados com homens sãos e férteis. Nestes estudos, os pesquisadores sugeriram que o estresse oxidativo seria o responsável pela interrupção na espermatogênese. Mostafa et al. (2001), verificaram redução nos níveis de estresse oxidativo medidos através da dosagem de malondialdeído, um metabólito formado através da peroxidação de lipídios, em amostras espermáticas de homens varicocelectomizados, quando comparados com os níveis anteriores ao procedimento ($p<0,0001$), além de diminuição nos níveis de EROs ($p<0,0001$) e aumento nos níveis de antioxidantes ($p<0,0001$).

Zini et al. (1999), verificaram que homens varicocelectomizados apresentaram diminuição da porcentagem de espermatozóides com gota citoplasmática ($p=0,0003$) e aumento na porcentagem de espermatozóides normais ($p=0,005$) quando comparados com os parâmetros anteriores ao procedimento, indicando melhora na espermatogênese. Essa melhora

foi acompanhada também por diminuição na produção de EROs no sêmen e aumento na motilidade espermática.

Estudos histológicos relacionam a varicocele à diminuição na espermatogênese, a mudanças na célula de Sertoli e à morte de células germinativas o que causaria um aumento na taxa de células defeituosas no ejaculado (DUBIN; HOTCHKISS, 1969; MACLEOD, 1965; ZINI et al., 1999).

Sendo assim, utilizando-se o estudo da varicocele para a compreensão do estresse térmico testicular em bovinos, uma hipótese bastante plausível é a de que a diminuição da fertilidade de touros não adaptados em regiões tropicais, provavelmente se deve ao estresse térmico levando a um quadro de estresse oxidativo. Isto é, com o aumento da temperatura testicular, haveria um quadro de hipóxia, condição predisponente para a produção de espécies reativas ao oxigênio, que por sua vez seriam responsáveis pelos danos causados às células espermáticas.

4.4 ESTRESSE OXIDATIVO

4.4.1 Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Uma das hipóteses para a diminuição da qualidade do sêmen de animais submetidos ao estresse térmico é uma maior produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) que são radicais livres ("átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons despareados"; Warren et al., em 1987). Entre as espécies reativas de oxigênio, as mais importantes são o radical hidroxila ($\text{OH}^\cdot$), o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o óxido nítrico (NO_2). O ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio são os EROs formados

primariamente, sendo o H_2O_2 gerado através da dismutase enzimática ou não enzimática do ânion superóxido (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). Porém, a ERO mais reativo e prejudicial é o radical hidroxila, que pode ser formado através do H_2O_2 e do ânion superóxido, e também através da reação do ânion superóxido com o óxido nítrico produzindo o peroxinitrito ($\text{OONO}^\cdot$), que então irá se decompor para NO_2 e OH^- (HALLIWELL, 1991) (Esquema 1).

Esquema 1: Formação das espécies reativas de oxigênio (EROs), modificado de Chabot et al., 1998:

4.4.1.1 Ânion superóxido (O_2^-)

O ânion superóxido, gerado a partir da molécula de oxigênio pela adição de um elétron, apesar de ser um radical livre, não é altamente reativo pois não consegue penetrar em membranas lipídicas, ficando restrito ao compartimento onde é produzido. O ânion superóxido parece ser o produto primário do sistema de produção de EROs, gerando o peróxido de hidrogênio após uma reação de dismutase. A formação do superóxido acontece espontaneamente, especialmente no ambiente aeróbico, rico em elétrons, próximo à

membrana mitocondrial interna, que ocorre devido ao escape de elétrons da cadeia respiratória (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

O mecanismo de defesa contra esta ERO se baseia na dismutase de duas moléculas deste ânion pela superóxido dismutase (SOD), com a formação de uma molécula de oxigênio (O_2) e uma molécula de peróxido de hidrogênio, que possui, por sua vez, ação como EROs. Outro papel importante do superóxido, é a reação com íons de metais (Cu^{2+} e Fe^{3+}), formando novos íons (Cu^+ e Fe^{2+}), importantes na formação de moléculas do radical hidroxila ($OH^\cdot$), importante espécie reativa de oxigênio (MATÉS, 2000).

4.4.1.2 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

O H_2O_2 não é um radical livre, porém mesmo assim, é importante principalmente devido à sua habilidade de penetrar em membranas biológicas. Esta substância age como intermediário na formação de mais moléculas de EROs, como o radical hidroxila ($OH^\cdot$) formado pela oxidação de metais de transição. O principal metal de transição responsável pela transformação do H_2O_2 em $OH^\cdot$ é o ferro, através da reação de Fenton, que ocorre, basicamente, através da reação de uma molécula de Fe^{2+} e uma molécula de H_2O_2 , com a conseqüente produção de uma molécula de $OH^\cdot$, uma molécula de OH e uma molécula de Fe^{3+} , que, por sua vez, pode ser reduzido novamente para Fe^{2+} , sob a ação do ânion superóxido e da superóxido dismutase.

A remoção do H_2O_2 ocorre por pelo menos dois sistemas enzimáticos antioxidantes, a catalase e a glutathione peroxidase (MATES et al., 1999).

Estudos realizados por vários pesquisadores indicam que o H_2O_2 é a ERO que causa mais danos aos espermatozóides *in vitro*, principalmente devido à sua alta capacidade em

penetrar membranas biológicas (AITKEN et al., 1993b; ARMSTRONG et al., 2001; DE LAMIRANDE; GAGNON, 1992). Armstrong et al. (2001), sugeriram que o H_2O_2 possui função deletéria em relação aos níveis intracelulares ATP, atuando na diminuição da motilidade espermática.

4.4.1.3 Radical hidroxila (-OH)

Devido à sua alta reatividade com biomoléculas, o -OH é, provavelmente, a ERO que causa mais danos aos sistemas biológicos (BETTERIDGE, 1999; HALLIWELL, 1987). Este radical é formado a partir do peróxido de hidrogênio, em uma reação catalisada por íons de metais (Fe^{2+} ou Cu^+), geralmente ligados em complexos com proteínas como a ferritina (HALLIWELL, 1997).

4.4.1.4 Ânion óxido nítrico (NO^-)

O óxido nítrico apresenta aspectos similares ao O_2^- visto que não reage diretamente com a maioria das biomoléculas apesar de seu elétron desapareado. O NO^- reage facilmente com outros radicais livres, gerando principalmente radicais menos reativos, funcionando então, como um antioxidante. Porém, se O_2^- for produzido em grandes quantidades paralelamente com o NO^- , ambos reagem produzindo o peroxidonitrito ($OONO^-$), altamente citotóxico.

4.4.2 EROs vs. *Espermatozóide*

A célula espermática é altamente susceptível aos danos causados pelas EROs, devido à alta quantidade de ácidos graxos poli-insaturados presentes em sua membrana plasmática e baixas concentrações de enzimas antioxidantes em seu já reduzido citoplasma (AITKEN; FISHEL, 1994; DE LAMIRANDE; GAGNON, 1995; SHARMA; AGARWAL, 1996).

As EROs, devido à sua alta reatividade, produzem extensivos danos a proteínas, além de modificações de citoesqueleto e alterações de alguns mecanismos celulares (SHARMA; AGARWAL, 1996).

A célula espermática humana faz parte de uma lista crescente de células que exibem a capacidade de gerar EROs quando incubadas em condições anaeróbicas. A produção espermática de EROs ocorre principalmente por células morfologicamente anormais e, dentre estas, especialmente as células que possuem resíduos de citoplasma (gotas proximal e distal; GOMEZ et al, 1998). Acredita-se que a presença deste citoplasma residual aumentaria a capacidade destas células imaturas de gerar NADPH (nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato reduzida), que serve como fonte de elétrons para a produção de EROs (AITKEN; BAKER, 2002).

Outros fatores responsáveis pela maior produção de EROs por células, espermáticas imaturas, seriam um aumento na disponibilidade de enzimas ligadas à membrana, responsáveis pela produção de EROS e, possivelmente a falha na elaboração de inibidores intrínsecos da atividade redutora da membrana plasmática (VERNET et al., 2001).

Espermatozóides imóveis e espermatozóides morfologicamente normais porém, funcionalmente anormais, também são fontes de EROs (ENGEL et al., 1999). Rhemrev et al., em 2001, verificaram que a produção de EROs por espermatozóides imóveis, funcionalmente

e/ou morfologicamente anormais ocorre, provavelmente devido à inativação dos sistemas antioxidantes destas células.

Esta produção de EROs por espermatozóides é um processo fisiológico normal, sendo importante para a regulação da taxa de hiperativação, para a ocorrência da reação acrossômica e para a fusão espermatozóide / oócito (AITKEN et al., 1991; AITKEN, 1997; DE LAMIRANDE et al., 1993; DE LAMIRANDE et al., 1997; DE LAMIRANDE; GAGNON, 1993; GRIVEAU et al., 1994; KODAMA et al., 1996; SENGOKU et al., 1998).

O mecanismo de ação das EROs na fisiologia normal do espermatozóide ainda não foi completamente elucidado porém, resultados dos experimentos convergem para a definição de que os processos de hiperativação, capacitação, ligação com a zona pelúcida e reação acrossômica sejam processos oxidativos ou regulados por redução.

Apesar do efeito fisiologicamente normal das EROs na fisiologia espermática, um desbalanço entre a produção e a eliminação de EROs no sêmen acarreta efeitos prejudiciais ao espermatozóide. A excessiva produção de EROS, também chamada de estresse oxidativo positivo (EOP), é definida como a situação em que há uma mudança no balanço de EROs levando a um efeito pró-oxidativo, que ocorre tanto pelo excesso de EROs como pela diminuição de antioxidantes (DE LAMIRANDE; GAGNON, 1995).

Em sêmen humano, Kessopoulos et al. (1994), sugeriram que a maior fonte de produção de EROs seriam os leucócitos, presentes mesmo em homens férteis. No entanto, Wolff (1995), verificou que os EROs, gerados por leucócitos, são deletérios às células espermáticas apenas na ausência de sistemas antioxidantes, como vistos em infecções agudas no testículo e epidídimo. Também, Aitken et al. (1992), verificaram que quando todos os traços de leucócitos foram removidos de amostras seminais contaminadas por estas células, as quantidades geradas de EROs eram inversamente correlacionadas com a qualidade e funções espermáticas.

Resultados de vários estudos com humanos, indicam que os níveis de EROs estão positivamente correlacionados com prejuízos para a concentração, a motilidade e a morfologia espermáticas, bem como, com a diminuição na taxa de reação acrossômica, capacitação espermática e ligação com o oócito (AGARWAL et al, 1994; AITKEN et al, 1989a,b; AITKEN et al., 1995; AITKEN; CLARKSON, 1988; IWASAKI; GAGNON, 1992; RAO et al, 1989).

Paqualotto et al. (2000), verificaram uma correlação negativa ($r=-0,34$, $p=0,003$) entre os níveis de EROs e concentração espermática em homens. Entretanto Rhemrev et al. (2001), discutem a validade desta correlação visto que a maioria das dosagens realizadas de EROs utiliza, como parâmetro, a concentração de EROs pelo número de espermatozóides. Isto levaria a um efeito matemático que poderia ser responsável pelas correlações encontradas entre a concentração espermática e os níveis de EROs.

Os danos causados pelos EROs na motilidade espermática se devem, principalmente, a uma cascata de eventos que resultam em uma diminuição na fosforilação de proteínas do axonema e a imobilização do espermatozóide, ambos relacionados com uma redução na fluidez da membrana plasmática (DE LAMIRANDE; GAGNON, em 1995).

Outro fator que provocaria a diminuição da motilidade seria a difusão do H_2O_2 na célula, através das membranas mitocondrial e/ou plasmática, inibindo a atividade da glicose-6-fosfato-desidrogenase, que controla o fluxo de glicose que, por sua vez, controla a disponibilidade da NADPH.

Estudos realizados *in vitro* indicam que a perda de motilidade pode também estar relacionada à diminuição nos níveis de ATP espermático, causada pelas EROs (AITKEN et al., 1993a,b,c; DE LAMIRANDE; GAGNON, 1992). Nestes estudos, as EROs produzidas através do sistema hipoxantina e xantina oxidase causaram a diminuição dos níveis de ATP intracelular espermático, concomitantemente à diminuição na motilidade espermática.

Resultados de experimento realizado por Rhemrev et al., em 2001, confirmam a importância da diminuição de ATP intracelular. Neste experimento, os pesquisadores propõem, baseados em seus achados, que a diminuição do ATP mitocondrial seria provocada por EROs que lesionariam a membrana mitocondrial, entrando na mitocondria e causando a diminuição tanto de ATP e NADPH, como de superóxido dismutase, importante enzima antioxidante. A diminuição de ATP e NADPH seria importante na diminuição de outro mecanismo de proteção antioxidante, o sistema glutatona peroxidase e glutatona redutase, metabolizantes do peróxido de hidrogênio e que é dependente do NADPH (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

Os danos à membrana plasmática espermática, e os consequentes prejuízos causados à morfologia espermática e às taxas de reação acrossômica, capacitação espermática e ligação entre espermatozóide e oócito, se devem, provavelmente, à peroxidação dos ácidos graxos insaturados da membrana plasmática espermática (peroxidação lipídica; ALVAREZ et al., 1987; AITKEN; CLARKSON, 1987a,b), principalmente os ácidos graxos que possuem mais de 2 ligações duplas carbono-carbono (AGCC). A maioria dos AGCCs possui ligações duplas não conjugadas, separadas por grupos metileno. A presença de ligações duplas adjacentes a grupos metileno torna as ligações entre carbono e hidrogênio (C-H), mais fracas e, portanto, torna o mais susceptível a se soltar. Uma vez que este hidrogênio se solta, ocorre a produção de um radical que, então, pode ser oxidado. Isto significa que os lipídios que possuem muitas interrupções de ligações duplas de metileno são mais susceptíveis à peroxidação lipídica (BLAKE et al., 1987).

Estudos realizados por Ollero et al. e Gil-Guzman et al., ambos em 2001, revelaram que os níveis de EROs no sêmen de humanos se mostraram negativamente correlacionados ($r=-0,64$ com $p=0,01$; $r=-0,44$ com $p<0,0001$, respectivamente) com a porcentagem de

morfologia espermática normal, segundo os parâmetros da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1999).

Aziz et al. (1996), criaram um índice para a avaliação espermática que se baseia na análise morfológica dos espermatozóides de uma determinada amostra e que leva em conta o total de defeitos espermáticos observados, isto é, se uma célula apresentar dois defeitos, serão levados em conta os dois defeitos, sendo então obtido o índice através da divisão entre o número total de defeitos observados e o número de espermatozóides avaliados ao acaso. Utilizando este índice, Saleh e Agarwal, em 2002, verificaram correlação positiva ($r=0,31$ com $p=0,01$) entre o mesmo e os níveis de EROs.

Um dos fatores de maior significância no que diz respeito ao estresse oxidativo é a sua alta correlação negativa com a fertilidade. Vários estudos em humanos associam a produção ou presença de EROs com prejuízos na função espermática.

Iwasaki e Gagnon (1992), detectaram a formação de EROs em 40% dos pacientes tratados em uma clínica de infertilidade masculina. Mazzili et al., em 1994, verificaram a presença do ânion superóxido em 87% (115/132) das amostras seminais provenientes de homens normozoospermicos inférteis e em 55% (11/20) das amostras seminais de homens inférteis ($p<0,05$).

Aitken et al. (1991), observaram que a incidência de gestação espontânea se mostrou negativamente correlacionada com a geração de EROs em cerca de 50% dos pacientes oligozoospermicos que exibiram aumentos na produção de EROs.

Paqualotto et al. (2000), verificaram que pacientes inférteis possuíam níveis mais altos ($p<0,005$) de EROs quando comparados a homens com fertilidade comprovada.

Sengoku et al. (1998), verificaram que, amostras de sêmen humano, incubadas com altas concentrações de óxido nítrico (NO), apresentaram perda de motilidade, viabilidade e capacidade de se ligar à oócitos *zona-free* e à hemizona, ambas homólogas. Porém, níveis

baixos de NO não prejudicaram a motilidade e aumentaram a taxa de capacitação espermática e a taxa de ligação a hemizona homóloga. Nestas amostras, os baixos níveis de NO não tiveram influência sobre taxa de reação acrossômica e sobre a taxa de penetração em oócitos *zona-free* homólogos. Whittington et al., em 1999, observaram que 72% (64/89) dos homens inférteis produziram níveis detectáveis de EROs, número significativamente maior ($p < 0,01$) que os 25% (17/67) dos homens com fertilidade comprovada.

4.4.3 Mecanismos de Proteção Antioxidante no Sêmen

Freqüentemente define-se um antioxidante como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações, quando comparadas com às de um substrato oxidável, retarda ou previne significativamente a oxidação deste substrato (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

O plasma seminal humano possui um mecanismo de proteção contra o estresse oxidativo que compensa a deficiência de enzimas citoplasmáticas no espermatozóide (DONELLY et al., 1999), através de uma série de antioxidantes enzimáticos tais como a superóxido dismutase (SOD; ALVAREZ et al., 1987), o sistema glutatona peroxidase / glutatona redutase (GPx/GRD; CHAUDIERE et al., 1984) e catalase (JEULIN et al., 1989). Além destes, existem, no plasma seminal, antioxidantes não enzimáticos, tais como, o ascorbato (FRAGA et al., 1991), o urato (THIELE et al., 1995), o α -tocoferol (Vitamina E; AITKEN; CLARKSON, 1988), o piruvato (DE LAMIRANDE; GAGNON, 1992), a glutatona (LENZI et al, 1994), a taurina e a hipotaurina (ALVAREZ; STOREY, 1983). Os mecanismos de defesa antioxidante, segundo Saleh e Agarwal (2002), exercem proteção através da prevenção, da interceptação e do reparo das reações de oxidação.

A prevenção da formação de EROs é a primeira linha de defesa contra a oxidação. Este nível de proteção tem como principal meio de controle a quelatação de metais de transição que, por sua vez, ao se soltarem dos produtos da redução do oxigênio, produzem oxidantes secundários ainda mais reativos, como por exemplo o radical hidroxila (HALLIWELL, 1990).

A interceptação dos EROs se baseia na quebra da reação em cadeia que ocorre com os radicais livres para a formação de produtos oxidantes. Esta quebra promovida por certos antioxidantes, como por exemplo o α -tocoferol, deve resultar em produtos finais não radicais, isto é, sem elétrons despareados. (SIES, 1993).

O reparo dos danos provocados por agentes oxidantes pode ocorrer em alguns casos. Porém, nos espermatozóides, este reparo se torna impossível devido à falta de sistemas de enzimas citoplasmáticas necessárias à esta função. Esta característica, aliada a grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados em sua membrana, fazem do espermatozóide uma célula ímpar por sua susceptibilidade à oxidação lipídica (ALVAREZ et al., 1987; AITKEN et al., 1989a,b).

4.4.3.1 Superóxido dismutases (SOD)

As superóxido dismutases foram as primeiras enzimas metabolizantes de EROs a serem descobertas (ALVAREZ et al., 1987). Na reação catalisada pelas SODs, duas moléculas de O_2^- formam uma molécula de O_2 e uma de H_2O_2 , esta última destruída posteriormente pela catalase ou pelo sistema glutathione peroxidase. Outro papel importante das SODs é proteger as desidratases (ácido dihidroxil desidratase, aconitase, 6-phosphogluconase desidratase e fumarases A e B), contra a inativação pelo radical superóxido (BENOV; FRIDOVICH, 1998). Segundo Matés (2000), as SODs, em humanos, são

classificadas em 3 tipos: superóxido dismutase mitocondrial (Mn-SOD), superóxido dismutase do citosol (CuZn-SOD) e a SOD extracelular (EC-SOD).

A superóxido dismutase mitocondrial (Mn-SOD), é uma enzima antioxidante intracelular localizada na mitocôndria e que tem no Manganês o seu sítio ativo (LAKARI, 2002; NORDBERG; ARNÉR, 2001; MATÈS, 2000). A ação desta enzima ocorre através da transformação do Manganês III, presente em sua molécula, para Manganês II e novamente para Manganês III, catalisando a dismutase do ânion superóxido. O Mn-SOD é a enzima antioxidante primária que remove os ânions superóxido produzidos pela cadeia respiratória na mitocôndria, principal fonte de radicais livres no interior das células (MATÈS, 2000).

A superóxido dismutase do citosol (Cu/Zn-SOD) é uma enzima antioxidante intracelular, localizada principalmente no citosol (LAKARI, 2002). A Cu/Zn-SOD possui o cobre e o zinco em seu sítio ativo, sendo o cobre essencial para sua atividade enzimática catalítica e o zinco para dar estabilidade à sua estrutura protéica. Esta enzima ocorre em maior concentração na célula que a Mn-SOD, porém estudos indicam que a Cu/Zn-SOD é menos importante que a Mn-SOD, visto que animais transgênicos que não produzem esta enzima são capazes de se adaptar possuindo um fenótipo aparentemente normal. Ratos com ausência da enzima Mn-SOD não sobrevivem por mais que três semanas (MATÈS, 2000; NORDBERG; ARNÉR, 2002).

A superóxido dismutase extracelular (EC-SOD) é uma glicoproteína encontrada em espaços intersticiais de tecidos e em fluidos extracelulares, correspondendo à maior parte da atividade das SODs do plasma, linfa e fluidos sinoviais (MATÈS, 2000). A EC-SOD é também o maior antioxidante na parede intersticial dos vasos sanguíneos e a única enzima extracelular conhecida, destinada a eliminar o ânion superóxido (ENGHILD et al., 1999; MATÈS, 2000). Esta enzima também contém cobre e zinco em seu sítio ativo (LAKARI, 2002) e controla a disponibilidade do ânion superóxido extracelular, importante para a

inativação do NO, importante oxidante. Animais transgênicos que não produzem esta enzima são saudáveis, porém, quando expostos a doses letais de oxigênio, morrem antes que ratos normais. Além disso, ratos que produzem mais EC-SOD são mais resistentes à hiperoxia e à lesões pulmonares induzidas por vírus (LAKARI, 2002).

Estudos em ratos e humanos indicam que a SOD é expressa em diversos tecidos do trato reprodutivo masculino, nos quais incluem-se, o testículo, o epidídimo, a próstata e a vesícula seminal (JOW et al., 1993; ZINI et al., 2000).

4.4.3.2 *Catalase*

A catalase é uma das enzimas mais eficientes dentre as conhecidas, e se localiza principalmente nos peroxissomos das células de mamíferos e age catalisando a reação que transforma duas moléculas de H_2O_2 em duas moléculas de água (H_2O) e uma de oxigênio (O_2) (NORDEBERG; ARNÉR, 2001), além de ter sua eficiência comprovada pois nenhuma concentração de H_2O_2 pode saturá-la (LLEDÍAS et al., 1998).

4.4.3.3 *Glutathione peroxidase (GPx) / Glutathione reductase (GRD)*

As glutathione peroxidases (GPx) são uma família de enzimas que podem ser divididas em dois grupos, as selênio-dependentes e as selênio independentes. As enzimas do grupo selênio dependente podem decompor o H_2O_2 e vários hidro ou lipoperóxidos. Nesta reação, catalisada pela glutathione peroxidase, a glutathione reduzida (GSH) é usada como substrato para metabolizar o H_2O_2 , resultando em H_2O e glutathione oxidada (GSSG). A glutathione

oxidada, por sua vez, pode ser reduzida novamente para GSH pela enzima glutathione reductase (GRD), dependente do NADPH (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989).

O mecanismo catalítico das GPx envolve a oxidação de seu sítio ativo selenolato para ácido selênico. Com a adição de uma molécula de GSH, o ácido selênico é transformado em seleniosulfídio agregado à glutathione, que pode ser regenerado para o selenonato e glutathione oxidada (GSSG) pela adição de uma segunda molécula de GSH. Deste modo, duas moléculas de GSH são oxidadas para GSSG que, subsequentemente, podem ser reduzidas pela glutathione reductase, a enzima redutora de GSSG mais abundante em mamíferos (NORDBERG; ARNER, 2001).

As glutathione selênio-dependentes podem ser divididas em quatro formas geneticamente distintas, GPx1, GPx2, GPx3 e GPx4. A GPx2 é encontrada no citosol e a GPx3, no meio extracelular, e são pouco detectadas na maioria dos tecidos, exceto trato gastrointestinal e rins. A GPx1 e a GPx4 são localizadas na maioria dos tecidos estando a GPx1 restrita às mitocôndrias e a GPx4 ao citosol e à membrana (MATÈS, 2000).

A GPx1 provoca a redução de hidroperóxidos de ácidos graxos e H_2O_2 utilizando a glutathione reduzida. Já a GPx4 pode reduzir diretamente hidroperóxidos de fosfolípidos, de ácidos graxos e de colesterol, que são produzidos em membranas peroxidadas e lipoproteínas oxidadas (IMAI et al., 1998). A GPx1 é predominantemente presente em eritrócitos, rins e fígado e a GPx4 é altamente expressa nas células epiteliais renais e nos testículos.

4.4.3.4 Antioxidantes seminais e fertilidade

Vários são os estudos sobre a importância dos antioxidantes na prevenção do estresse oxidativo no sêmen, porém, existem ainda muitas controvérsias sobre a importância de cada uma das enzimas antioxidantes nos danos causados pelo estresse oxidativo no sêmen.

Alvarez et al. (1987), verificaram altas correlações entre a atividade da superóxido dismutase com o índice de peroxidação lipídica espontânea ($r=0,97$, $p<0,05$) e com o tempo de perda de motilidade ($r=0,87$, $p<0,05$), em amostras de sêmen humano, indicando ser a SOD, o principal mecanismo de proteção contra a peroxidação lipídica em humanos.

Miesel et al. (1997), verificaram que homens inférteis possuíam menor nível de catalase quando comparados com homens férteis, o que não ocorreu com os níveis de SOD, nos quais não houve alteração entre os grupos.

Já Zini et al. (2000), verificaram que os níveis de catalase não diferiram entre homens férteis e inférteis. Neste mesmo experimento, os níveis de SOD foram significativamente maiores nos homens inférteis.

Aitken et al. (1996), verificaram que altos níveis de SOD estavam associados à função espermática defeituosa devido à alta susceptibilidade das células espermáticas aos efeitos citotóxicos do H_2O_2 . Neste experimento, os níveis de SOD foram negativamente correlacionados com os índices de movimento espermático e com a capacidade de fusão com o oócito ($r=-0,55$, $p<0,001$ e $r=-0,058$, $p<0,001$, respectivamente).

Griveau e Le Lannou (1994), verificaram que as adições de SOD e GPx em amostras espermáticas humanas evitaram a perda de motilidade após 24 horas de incubação. A adição de SOD melhorou as taxas de hiperativação e reação acrossômica, o que não ocorreu com a adição de glutathione peroxidase e catalase.

Estudos de Ursini et al. (1999), indicam que a GPx4 possui função dupla na célula espermática de ratos, sendo enzimaticamente ativa em espermátides, mas insolúvel, enzimaticamente inativa e funcionando como proteína estrutural em espermatozóides maduros. Neste estudo, a proteína originada do GPx4 correspondia a 50% da cápsula que sustenta a *helix* da mitocôndria.

Pfeifer et al. (2001), verificaram que uma variante do GPx4, que utiliza um gene alternativo, é específica do núcleo espermático participando da condensação da cromatina em espermátides.

Em experimento de Li et al. (1999), os níveis testiculares de glutathione peroxidase foram mensurados em ratos após administração de cocaína. Neste experimento, os índices de estresse oxidativo, medido através dos níveis de malondialdeído, metabólito originado da peroxidação lipídica, aumentaram posteriormente à diminuição dos níveis de glutathione peroxidase. Estes resultados sugerem que a produção de EROs no testículo, provocada pela cocaína, foi controlada pela glutathione peroxidase. Porém, com o consumo deste antioxidante e os níveis ainda elevados de EROs, os índices de peroxidação lipídica testicular aumentaram. Os autores sugerem, portanto, que a glutathione é o mais importante agente antioxidante em nível testicular.

Calamera et al. (2001), incubaram amostras de sêmen por 48 horas e observaram a produção de níveis significativos de EROs. Neste experimento, amostras tratadas com catalase não apresentaram melhora significativa.

Em experimentos de Aitken et al. (1993a), Griveau et al. (1995) e Armstrong et al. (1999), a mistura de intermediários tóxicos de oxigênio gerados pelo sistema xantina oxidase, interrompeu as funções do espermatozóide humano, sendo que, esta interrupção pôde ser completamente revertida pela adição de catalase. No estudo de Armstrong, a catalase inibiu a perda de motilidade e dos níveis de ATP, induzida pelo sistema xantina oxidase, sendo que a

adição de superóxido dismutase não apresentou o efeito de proteção semelhante ao da catalase.

Em um sistema de produção de EROs proposto por Twigg et al., em 1998, a adição de NADPH, provável indutor de produção de EROs intracelular, provocou altos níveis de peroxidação lipídica e danos na motilidade e no DNA espermático. Neste experimento, a adição de SOD e catalase não foi eficaz na prevenção dos efeitos adversos das EROs. Segundo o autor, isso ocorreu provavelmente devido à indução da formação de EROs na interior da célula, indicando que os níveis de proteção antioxidante dependem dos locais de produção destes radicais e conseqüente peroxidação lipídica.

4.4.4 Avaliação do Estresse Oxidativo

Muitas pesquisas têm sido feitas no campo da infertilidade masculina na espécie humana, a fim de desenvolver índices de estresse oxidativo que possam discriminar e quantificar, com acurácia, os efeitos do estresse oxidativo na infertilidade masculina. Visto que, o estresse oxidativo corresponde a um desequilíbrio entre a produção de EROs e a proteção oxidativa no sêmen, torna-se concebível que a avaliação do estresse oxidativo seja feita através da mensuração dos níveis de EROs e/ou seus metabólitos, assim como dos níveis de antioxidante no sêmen.

Para a dosagem de EROs no sêmen são necessárias técnicas muito sensíveis visto que a produção de EROs pelo sêmen, é relativamente baixa quando comparada com a produzida por leucócitos. Além disso, a meia-vida das EROs é muito baixa (LUNEC, 1989). Para mensurá-las são usadas técnicas de quimioluminescência que, mesmo bastante sensíveis, não

conseguem dosar certos níveis de EROs (10×10^4 fótons contados por minuto) que ocorrem em amostras seminais de homens normais (SHEKARRIZ et al., 1995a,b).

A mensuração dos níveis de antioxidantes pode ser realizada por quimioluminescência, pela dosagem imunocitoquímica e pela dosagem enzimática.

A técnica de quimioluminescência é utilizada para a mensuração da capacidade antioxidante total das amostras (ATA), através de sondas específicas (PASQUALOTTO et al., 2001; SHARMA et al., 1999).

A dosagem imunocitoquímica é realizada através da adição de anticorpos anti-antioxidantes específicos, que irão se ligar ao antioxidante presente na amostra, utilizando microscopia de epifluorescência e fotografia ou citômetro de fluxo para a leitura (LASSO et al., 1994).

A dosagem enzimática é realizada através das propriedades catalizantes dos antioxidantes. Nesta técnica, são utilizados substratos que serão catalizados pelos antioxidantes específicos. A leitura pode ser realizada através de espectrofotometria, medindo-se o consumo destes substratos. Como exemplo, temos o ensaio para a mensuração da catalase, no qual adiciona-se H_2O_2 , que será consumido pela enzima presente na amostra, medindo-se o consumo deste agente oxidante (MOSTAFA, 2001; RICE-EVANS, et. al. 1991).

A dosagem de componentes oxidados, que se mantêm nos fluidos corporais, é uma técnica mais específica, sendo um destes componentes o malondialdeído (MDA), que pode ser usado como um índice de peroxidação lipídica (AITKEN et al., 1993b,c; JANERO, 1990; SIDHU et al, 1998; SLATER, 1984). A ocorrência da peroxidação lipídica em espermatozóides leva a um acúmulo progressivo de hidroperóxidos lipídicos na membrana plasmática espermática que, posteriormente, se decompõem para formar o MDA. A avaliação

dos níveis de MDA tem sido extensivamente utilizada, nas últimas quatro décadas, como marcador da peroxidação lipídica (JANERO, 1990; SLATER, 1984).

Entre os diferentes métodos analíticos estabelecidos, a reação com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) é o mais utilizado. Nesta reação, o composto formado pela reação entre o MDA e o TBA pode ser mensurado através de absorbância ou fluorescência. Estes produtos são então chamados de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs). Este método possui algumas desvantagens visto que, a alta temperatura e o baixo pH durante a reação podem causar a formação de alguns produtos de peroxidação relacionados à técnica. Além disso, diferentes substâncias, outras que não o MDA, podem reagir com o TBA, resultando em produtos de similar absorbância (JANERO, 1990). Porém, a correlação entre valores esperados de peroxidação lipídica e a mensuração dos níveis de TBARs é alta. Além disto, experimentos realizados com a mensuração de TBARs e sua correlação com a capacidade de fusão entre espermatozóide e oócito obtiveram altos coeficientes.

Zabludovsky et al. (1999), verificaram que os níveis de TBARs em amostras de sêmen humano foram inversamente correlacionados ($r=-0,59$, $p<0,01$) com as taxas de fertilização *in vitro*. Além disso, os níveis de TBARs foram significativamente maiores nas amostras que possuíam a taxa de fertilização igual a zero, quando comparadas com as amostras com taxa de fertilização maior que zero. Neste mesmo experimento, foram verificadas correlações entre os níveis de TBARs e volume espermático, número total de espermatozóides no ejaculado e morfologia espermática normal ($r=-0,48$, $p<0,01$; $r=-0,42$, $p<0,01$; $r=-0,35$, $p<0,04$, respectivamente).

Aitken et al. (1993b), observaram correlação negativa ($r=-0,58$, $p<0,0001$) entre os níveis de TBARs e a capacidade de fusão espermatozóide / oócito em humanos.

Alvarez et al. (1987), verificaram que, enquanto o tempo decorrido para a perda total de motilidade de amostras espermáticas variou bastante, o mesmo não ocorreu com os níveis de

TBARs, indicando um ponto letal de peroxidação lipídica *in vitro*, isto é, uma determinada concentração de TBARs no sêmen poderia expressar, com razoável acurácia, o ponto em que a peroxidação lipídica induzida seria tal que mataria todos os espermatozóides de uma determinada amostra.

Li et al. (1999), administraram cocaína a ratos e verificaram que os níveis de TBARs no testículo foram maiores ($p < 0,05$) que os observados em animais controle.

Uma ferramenta importante e muito utilizada, para a avaliação dos níveis de proteção antioxidante e de peroxidação lipídica, é a geração artificial de EROs. Esta indução aumentaria o poder do ensaio com ácido tiobarbitúrico visto que permitiria avaliar dois aspectos da peroxidação lipídica espermática, a disponibilidade de hidroperóxidos lipídicos na membrana plasmática do espermatozóide, pelos quais iria se iniciar a reação peroxidativa em cadeia, e a habilidade do espermatozóide em inibir a propagação deste processo através de mecanismos antioxidantes (AITKEN et al., 1993b).

Uma das formas de se induzir a produção de EROs é através da reação entre a hipoxantina e a xantina oxidase que resultaria em uma redução univalente e bivalente da molécula de oxigênio (O_2) para gerar o ânion superóxido (O_2^-) e do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), respectivamente. Estes radicais irão dar origem ao radical hidroxila ($OH^\cdot$), que é altamente reativo e especialmente deletério para o espermatozóide (AITKEN et al., 1993a,b; ARMSTRONG et al., 1999; SIKKA, 1996).

Outra técnica muito utilizada para provocar a peroxidação lipídica, é através da indução pelo sistema sulfato de ferro + ácido ascórbico. Esta técnica se baseia na formação de íons de ferro que irão catalisar a quebra de hidroperóxidos pré-existentes iniciando a propagação da reação em cadeia da peroxidação lipídica (AITKEN et al., 1993c; GRIVEAU et al., 1995), assim, ocorrerá a peroxidação promovida pelo ferro, através da reação de Fenton., na qual o ácido ascórbico provocaria a redução do Fe^{2+} para Fe^{3+} , que, por sua vez,

participaria na produção de OH^- a partir do H_2O_2 (AITKEN et al., 1993c; ENGEL et al., 1999).

Em modelo proposto por Twigg et al. (1998), a adição de NADPH exógeno em amostras espermáticas humanas foi capaz de gerar EROs *in vitro*, causando efeitos prejudiciais na motilidade e no DNA espermáticos. Este sistema baseia-se no fato de que a produção de EROs intracelular pelo espermatozóide é dependente do NADPH, que geraria elétrons para a produção inicial do ânion superóxido (AITKEN et al., 1997).

Sharma et al. (1999), criaram um índice de determinação do estresse oxidativo que levava em conta a relação entre níveis de EROS e níveis de antioxidantes. Resultados obtidos por estes pesquisadores indicaram que este índice é uma ferramenta importante na discriminação entre pacientes férteis e inférteis quando comparado com a dosagem de EROS ou de antioxidantes avaliadas individualmente.

4.4.5 Estresse Oxidativo em Touros

Em touros, poucos são os trabalhos relativos ao estresse oxidativo no sêmen.

Agrawal e Vanha-Perttula (1988), verificaram que quantidades substanciais de GPx foram encontradas em testículos, fluidos do trato reprodutivo e espermatozóides epididimários, porém, concentrações muito menores foram encontradas no ejaculado de touros.

Beconi et al. (1991), trabalhando com touros holandeses (*Bos taurus*), obtiveram menores níveis de TBARs e maiores taxas de espermatozóides com acrossomo íntegro, em amostras espermáticas incubadas com α -tocoferol, poderoso antioxidante não-enzimático, quando comparadas às amostras sem nenhuma proteção, indicando um maior índice de

peroxidação nestas últimas ($p < 0,05$). Foi observado também um menor consumo de superóxido dismutase nas amostras incubadas com α -tocoferol ($p < 0,05$). Tais achados, além da correlação negativa encontrada entre TBARs e a atividade enzimática da SOD ($r = -0,975$), indicam que a peroxidação lipídica de amostras espermáticas incubadas ocorreu pela produção de EROs que foi maior que o nível de proteção antioxidante já presente no sêmen.

Beorlegui et al. (1997), verificaram que os níveis de SOD foram maiores em touros holandeses (*Bos taurus*) com maior motilidade ($p < 0,05$). Também foram detectadas, nestas amostras, maiores porcentagens de espermatozóides que sofreram reação acrossômica induzida por cálcio ionóforo ($p < 0,05$), além de níveis menores de TBARs através da indução da peroxidação lipídica pela da adição de sulfato de ferro (FeSO_4) e ácido ascórbico, potente sistema oxidante. Também foram encontradas, neste experimento, correlações entre motilidade espermática e atividade enzimática da SOD e motilidade espermática e produção induzida de TBARs ($p = 0,92$ e $p = -0,80$, respectivamente).

O'Flaherty et al, em 1997, verificaram que a adição de α -tocoferol e SOD nos meios de capacitação espermática em bovinos provocaram diminuição nos níveis de TBARs ($p < 0,05$), porém diminuíram também os índices de capacitação espermática ($p < 0,05$). Estes resultados indicaram o efeito antioxidante da vitamina E e da SOD assim como os efeitos de níveis basais de EROs para promover a capacitação espermática também em espermatozóides bovinos. Os mesmos autores, em 1999, verificaram novamente o efeito das EROs na fisiologia espermática normal em bovinos. Neste experimento, amostras seminais bovinas foram tratadas com o sistema xantina-xantina oxidase para a produção de ânion superóxido, SOD e várias concentrações de peróxido de hidrogênio. Verificou-se que a adição de xantina-xantina oxidase provocou uma indução significativa na capacitação espermática ($p < 0,05$), sendo que a adição de SOD inibiu este efeito ($p < 0,05$). A adição de H_2O_2 em baixas concentrações ($< 25 \mu\text{M}$) provocou um maior índice de espermatozóides com acrossomos

reagidos ($p < 0,05$). Concentrações maiores que $25\mu\text{M}$ de H_2O_2 produziram efeitos deletérios na motilidade espermática. Os autores concluíram que o ânion superóxido seria importante no processo de capacitação e que o peróxido de hidrogênio participaria como indutor na reação acrossômica do espermatozóide bovino, porém em concentrações maiores, o H_2O_2 participaria do processo de peroxidação lipídica, extremamente deletério ao espermatozóide bovino.

5 MATERIAL E MÉTODO

5.1 LOCAL

As coletas de semên foram realizadas na Fazenda Don Pierino, região da cidade de Dourados, Mato Grosso do Sul, localizada a 22° latitude sul e 54° longitude oeste, em uma altitude de 458 metros, em relação ao nível do mar. Esta região apresenta clima tropical quente úmido com temperatura mínima em torno de 10° C, máxima de 35°C e temperatura média de 20 a 24°C. A precipitação pluviométrica média anual é de 1500-1600mm, com período de menor incidência no inverno e predomínio de maior incidência no verão

Gráfico 1 - Dados meteorológicos (temperatura média, máxima e mínima) da região de Dourados, MS – 01/04/2000 – 02/02/2002.

Fonte: ESTAÇÃO AGROCLIMATOLÓGICA DA EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE (EMBRAPA - CPAO)

Gráfico 2 – Umidade relativa (%) e incidência pluviométrica (mm de chuva) da região de Dourados, MS – 01/04/2000 – 02/02/2002.

Fonte: ESTAÇÃO AGROCLIMATOLÓGICA DA EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE (EMBRAPA - CPAO)

5.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS E MANEJO

Foram utilizados 20 touros adultos, sendo 20 da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) e 20 da raça Simental (*Bos taurus taurus*), com idades variando entre 3 e 4 anos. Os touros eram criados a campo e utilizados para monta natural. Os animais se encontravam em serviço, cobrindo fêmeas a campo, em regime de pastoreio e mantidos em mesmas condições de manejo. O pasto era constituído de braquiária (*Brachiaria* sp).

Destes 40 animais, apenas 27 (11 Nelore e 16 Simentais), puderam ser utilizados, visto que, apenas estes, estavam presentes em todas as coletas.

5.3 PERÍODO EXPERIMENTAL

Foram realizadas 4 coletas de sêmen no período de 2 anos. Estas coletas foram realizadas em quatro períodos: Agosto de 2000 (inverno), Fevereiro de 2001 (verão), Julho de 2001 (inverno) e Fevereiro de 2002.

5.4 COLETA DE SÊMEN

Os animais foram contidos em tronco apropriado, e após limpeza interna e externa do prepúcio com solução salina estéril; O sêmen foi coletado através do método de eletroejaculação, utilizando eletroejaculador . O sêmen foi coletado em tubo plástico graduado em mililitros, isolado de choque térmico e da luz por meio de um isopor que se encaixava ao tubo, previamente aquecido.

5.5 ANÁLISE DO SÊMEN

A avaliação do sêmen iniciava-se imediatamente após a coleta. O volume do ejaculado era aferido através de leitura direta no tubo de coleta, graduado em mililitros. A motilidade espermática era avaliada através da análise microscópica. Para isto, uma gota de sêmen era colocada entre lâmina e lamínula, sendo observada através de microscópio óptico de luz, com

aumento de 100 vezes. Para a avaliação da motilidade, verificou-se o percentual de células móveis que apresentavam movimento retilíneo progressivo (MPR).

Uma alíquota de cada amostra seminal coletada foi diluída em solução de formol salino, na diluição de 1:200, para posterior avaliação da morfologia espermática, que foi realizada através de preparações úmidas, entre lâmina e lamínula. As preparações úmidas foram então analisadas em microscópio de contraste de fases em aumento de 1000 vezes em imersão, sendo as anormalidades espermáticas quantificadas. Esta análise foi realizada no Laboratório de Andrologia, do Departamento de Reprodução Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

As anormalidades espermáticas foram classificadas em defeitos maiores e menores, sendo a soma dos defeitos considerada, para efeito de avaliação de cada amostra, como defeitos totais.

5.6 PROVAS BIOQUÍMICAS

Para a realização das análises de TBARs e de antioxidantes enzimáticos, amostras de sêmen foram congeladas diretamente em nitrogênio líquido, sem a adição de diluidores ou crioprotetores. As amostras foram processadas e analisadas posteriormente no Laboratório de Andrologia, do Departamento de Reprodução Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

5.6.1 Processamento Inicial das Amostras

Para a análise das enzimas antioxidantes, as amostras de sêmen que foram congeladas na fazenda, foram submetidas a choque frio. Para isto, as amostras após descongelamento em banho-maria a 37 °C, foram submetidas a dois ciclos de congelamento e descongelamento, sendo o congelamento realizado através da imersão das amostras em nitrogênio líquido e o descongelamento realizado em banho-maria a 37°C. O choque frio foi necessário para liberar as enzimas antioxidantes intracelulares, através do rompimento das membranas celulares (MENNELLA; JONE, 1980).

Após o processo de choque frio, as amostras de sêmen foram centrifugadas¹, por 15 minutos, com temperatura de 4°C e 10.000g, para obtenção do plasma seminal (sobrenadante).

5.6.2 Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico - TBARs

As determinações basearam-se na metodologia descrita por Ohkawa et al. (1979), que tem como fundamento a reação de duas moléculas de ácido tiobarbitúrico com uma molécula de malondialdeído, produzindo um complexo de coloração rósea, que é quantificado através de espectrofotometria num comprimento de onda de 532 nanômetros (nm). Esta reação ocorre à temperatura entre 90 e 100°C, em pH ácido.

Alíquotas de 500µL do plasma seminal e 1000µL de solução de ácido tricloroacético² a 10% (TCA 10%) foram centrifugadas por 15 minutos, com temperatura de 15°C e 18.000g, para que ocorresse a precipitação de proteínas.

¹ Centrífuga Eppendorf 5804R

² Sigma T 9159

Alíquotas de 500µL do sobrenadante foram colocadas em tubos de ensaio juntamente com 500µL de ácido tiobarbitúrico³ a 1% (TBA, 1%), dissolvido em hidróxido de sódio⁴² (NaOH) 0,05N, preparado instantes antes de ser utilizado. Os tubos contendo esta mistura foram incubados em banho fervente (100°C) por 10 minutos e resfriados em banho de gelo (0°C).

Os TBARS foram quantificados em espectrofotômetro⁵ em um comprimento de onda de 532nm. Os resultados foram comparados com uma curva padrão, feita previamente com malondialdeído⁶.

O malondialdeído (MDA) é uma das principais substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico e a concentração dos TBARS é determinada utilizando-se o valor $1,56 \times 10^5 \times M^{-1} mL^{-1}$ como coeficiente de extinção molar do malondialdeído (BUEGE e AUST, 1978).

A peroxidação lipídica no sêmen expressa-se em nanogramas de TBARS/mL de sêmen.

5.6.3 Atividade das Enzimas Antioxidantes

As alterações no metabolismo oxidativo foram estudadas determinando-se a atividade das enzimas antioxidantes: catalase e superóxido dismutase.

Todas as determinações foram realizadas em espectrofotômetro⁷ nas temperaturas e comprimentos de onda recomendados para cada enzima.

³ Sigma T 5500

⁴ Sigma S 8045

⁵ Ultrospec 3300pro, Amersham Pharmacia

⁶ Sigma 10,838-3

5.6.3.1 Catalase (E.C. 1. 11. 1. 6)

A atividade da catalase é determinada avaliando-se o consumo do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), durante 8 minutos, pela leitura espectrofotométrica a 230nm e 30°C (BEUTLER, 1975). O meio de reação deve conter 10 μL de amostra (plasma seminal), tampão Trisaminometano⁸/EDTA⁹ (concentração final 50mM e 250mM, respectivamente), pH 8,0 e 900 μM de H_2O_2 (concentração final de 9,0mM).

Os cálculos consideram o valor 0,071M⁻¹cm⁻¹ como coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio 0,071M⁻¹cm⁻¹ (⁶ H_2O_2):

Atividade da catalase = Δ de absorbância da amostra / 0,071 x diluições

5.6 3.2 Superóxido dismutase (SOD) (E.C. 1. 15. 1. 1)

A atividade da SOD é medida indiretamente através da taxa de redução do citocromo c pelo ânion superóxido (O_2^-) controlada por 5 minutos. O sistema xantina-xantina oxidase é empregado como gerador contínuo de O_2^- e este O_2^- causa redução do citocromo c.

A SOD total presente na amostra compete com o citocromo c pelo O_2^- e a atividade da SOD total é medida indiretamente, determinando-se a taxa de diminuição da redução do citocromo c (FLOHÉ; ÖTTING, 1984).

⁷ Ultrospec 3300 pro, Amersham Biosciences

⁸ Sigma 25,285-9

⁹ Sigma E9884

O meio de reação deve conter citocromo c¹⁰ (1μM), xantina¹¹⁷ (50μM), EDTA (100μM) e tampão fosfato de sódio¹² (50μM, pH 7,8). Realiza-se a adequação da atividade da enzima xantina oxidase necessária para a geração de O₂⁻ e redução do citocromo c em 0,025 unidades de absorbância por minuto, pois 1 unidade de atividade da SOD total corresponde a 50 % deste valor. O ensaio é realizado a 550nm e 25°C.

1 unidade de SOD, corresponde a 0,0125 unidades de absorbância/ minuto e portanto, x unidades de SOD na amostra corresponderá a (Δ absorbância da amostra - 0,025).

x unidades de SOD na amostra = (Δ absorbância da amostra - 0,025) / 0,0125 x diluições

5. 7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados através do programa SAS System for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA, 2000).

Através do aplicativo Guided Data Analysis, os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias. Caso não obedecessem a estas premissas foram transformados (logarítmo na base 10 - Log₁₀X; Raiz quadrada - RQ X; Quadrado - X²) e se a normalidade não fosse obtida empregava-se então, o procedimento NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica.

Para descrição dos resultados, foram empregados os desvios padrões e as médias (média ± desvio padrão) dos dados originais e os níveis de significância (p) dos dados originais, quando obedecessem às premissas; dos dados transformados, quando necessária a

¹⁰ Sigma C 3381

¹¹ Sigma X 2252

¹² Sigma S 9638

transformação; e dos dados analisados através da análise não paramétrica, quando não obedecessem às premissas e não houvessem transformações possíveis.

O nível de significância utilizado para rejeitar H_0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas entre as variáveis classificatórias (tratamentos) para uma determinada variável resposta. As variáveis classificatórias utilizadas foram raça (Nelore e Simental) e estação do ano (Inverno e Verão). As variáveis resposta avaliadas foram motilidade retilínea progressiva, porcentagem de defeitos maiores, porcentagem de defeitos menores, porcentagem de defeitos totais, concentração de TBARS, nível de atividade da catalase e nível de atividade da SOD.

As variáveis resposta foram analisadas através da correlação de Pearson (PROC CORR), sendo os resultados expressos através do coeficiente de correlação de Pearson (r) e seu nível de significância (p). Para a análise de correlação as variáveis referentes às anormalidades espermáticas foram analisadas uma a uma e classificadas em defeitos primários, secundários e totais (BLOM, 1950).

Na análise de variância foram verificados os efeitos das variáveis classificatórias estações do ano (Verão e Inverno), raças (Nelore e Simental) e a interação estações do ano X raças (Nelore/Inverno, Nelore/Verão, Simental/Inverno e Simental/Verão).

As variáveis resposta porcentagem de defeitos maiores e porcentagem de defeitos totais, não obedeceram à normalidade dos resíduos, sendo a mesma obtida através da transformação para o logaritmo de seus valores na base 10.

Considerou-se também, o efeito do ano de coleta, porém, para nenhuma das variáveis resposta analisadas, houve efeito do ano de coleta ou da interação entre o ano de coleta e as outras variáveis classificatórias. Sendo assim, o efeito do ano de coleta não foi considerado

As variáveis resposta motilidade retilínea progressiva, porcentagem de defeitos menores, concentração seminal de TBARS e nível de atividade da enzima superóxido

dismutase (SOD), não obedeceram às premissas, não sendo possível transformá-los. Estas variáveis foram então analisadas através do PROC NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica. Nestes casos utilizou-se o nível de significância do teste Wilcoxon para dois tratamentos, sendo os efeitos de raças, estações do ano e a interação raças X estações do ano, verificadas separadamente.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 MOTILIDADE RETILÍNEA PROGRESSIVA (MRP)

Os resultados referentes à variável resposta motilidade retilínea progressiva estão descritos nas tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1 - Efeito das estações do ano e das raças na motilidade retilínea progressiva, das amostras seminais de touros das raças Nelore e Simental, criados a campo, coletadas em invernos e verões consecutivos - Dourados - Mato Grosso do Sul - 2000-2002

	Nelore	Simental	p*	Inverno	Verão	p**
Motilidade retilínea progressiva (%)	60,9 ± 16,5	57,0 ± 20,7	0,51	57,6 ± 14,9	60,2 ± 22,1	0,19

* referente à comparação entre raças (Nelore e Simental);

** referente à comparação entre estações do ano (inverno e verão).

Tabela 2 - Efeito das estações do ano em função das raças na motilidade retilínea progressiva, das amostras seminais de touros das raças Nelore e Simental, criados a campo, coletadas em invernos e verões consecutivos. - Dourados - Mato Grosso do Sul - 2000-2002

	Nelore		p*	Simental		p**
	Inverno	Verão		Inverno	Verão	
Motilidade retilínea progressiva (%)	62,7 ± 14,0	59,2 ± 18,7	0,84	53,0 ± 14,4	61,3 ± 25,4	0,21

* referente à comparação entre inverno e verão dos touros da raça Nelore;

** referente à comparação entre inverno e verão dos touros da raça Simental.

Tabela 3 - Efeito das raças em função das estações do ano na motilidade retilínea progressiva, das amostras seminais de touros das raças Nelore e Simental, criados a campo, coletadas em invernos e verões consecutivos. - Dourados - Mato Grosso do Sul - 2000-2002

	Inverno		p*	Verão		p**
	Nelore	Simental		Nelore	Inverno	
Motilidade retilínea progressiva (%)	62,7 ± 14,0	53,0 ± 14,5	0,04	59,2 ± 18,7	61,3 ± 25,4	0,77

* referente à comparação entre Nelore e Simental apenas no inverno;

** referente à comparação entre Nelore e Simental apenas no verão..

Em relação à variável resposta motilidade retilínea progressiva (MRP) das amostras espermáticas, não houve diferenças estatísticas entre os touros das raças Nelore e Simental ($60,9 \pm 16,4$ e $57,6 \pm 20,7\%$, respectivamente; $p=0,51$), e nem entre os meses de inverno e verão ($57,6 \pm 14,9$ e $60,2 \pm 22,0\%$, respectivamente; $p=0,21$) (Tabela 1). Também não houve efeito da interação entre raças e estações do ano ($p=0,1720$). Da mesma forma, quando comparado o comportamento de cada raça nas diferentes estações, nenhuma delas apresentou diferenças de MRP entre verão e inverno (Tabela 2). Na comparação entre as raças dentro de cada estação separadamente, verificou-se que no verão, não houve diferenças estatisticamente significante entre as raças quanto à MRP. Por outro lado, os touros Nelore apresentaram maior MRP em relação aos touros Simental no inverno ($62,7 \pm 14,0$ e $53,0 \pm 14,4\%$, respectivamente; $p=0,042$). Esta diferença, por ocorrer no inverno, não era esperada, visto que os touros de origem zebuína são menos adaptados a temperaturas inferiores em relação aos touros de origem européia (FIELDS et al., 1979; MATHEVON et al., 1998).

Resultados semelhantes foram encontrados por alguns pesquisadores, porém com algumas variações.

Em experimento conduzido por Fields et al. (1979), na região subtropical da Flórida, Estados Unidos, touros *Bos indicus* (Brahma) e *Bos taurus* (Angus e Hereford) foram submetidos a coletas de sêmen no verão e inverno. Os touros de origem européia não apresentaram diferenças na MRP entre verão e inverno ($68 \pm 2,8$ e $70 \pm 2,8\%$, respectivamente; $p>0,05$). Já os touros Brahma apresentaram valores de MRP menores no verão em relação ao inverno subsequente ($37 \pm 4,9$ e $59 \pm 4,9\%$, respectivamente; $p<0,01$). Estes resultados porém, podem estar relacionados à imaturidade sexual dos touros Brahma, visto que as amostras foram coletadas inicialmente com os touros entre 13 a 16 meses de idade no verão e 19 a 22 meses no inverno subsequente.

Em experimento conduzido por Wildeus e Hammond (1993), em região semi-árida das Ilhas Virgens (Saint Croix), touros *Bos taurus* adaptados (Senepol) e não adaptados (Holandês) a ambientes tropicais, foram comparados quanto à influência das estações do ano nos padrões espermáticos. Na análise da MRP, não houve efeito da estação do ano (verão e inverno) das duas raças estudadas e nem interação estações do ano X raças. Porém, os touros Senepol apresentaram maior porcentagem de espermatozóides móveis em relação à raça holandesa (62,1% e 47,8%, respectivamente, $p=0,039$).

A ausência de diferenças entre estações do ano na porcentagem de espermatozóides móveis também foi verificada por Mathevon et al. (1998), em touros adultos da raça holandesa, criados no Canadá; Kumi-Dianka et al. (1981), em touros *Bos taurus* e *Bos indicus* de centrais de inseminação artificial, no Brasil; e Chacón et al. (1999), em touros *Bos taurus* e *Bos indicus* criados extensivamente, na Costa Rica.

Em experimento de Chandolia et al. (1999), amostras espermáticas de touros *Bos taurus* (Angus e Holandês) e *Bos indicus* (Brahman) foram submetidas à desafio por calor, sendo que não houve diferenças entre as raças na porcentagem de espermatozóides móveis, na velocidade espermática e na frequência de batimentos da cauda ($p<0,05$).

A motilidade espermática é uma variável da qualidade espermática cuja eficácia, quando utilizada isoladamente para prever a fertilidade de determinada amostra seminal, é muito discutida devido à ausência de correlação desta variável com a fertilidade, demonstrada por vários pesquisadores.

Smith et al. (1981), observaram que os testes rotineiros (motilidade retilínea progressiva, morfologia e concentração espermáticas), quando utilizados individualmente, não apresentaram correlação com a fertilidade de touros.

Em humanos, Wang et al. (1988) também verificaram que os testes rotineiros de análise espermática não foram suficientes para prever a fertilidade de amostras seminais

provenientes de homens férteis e inférteis. Nesse experimento somente a utilização da combinação destes testes com testes funcionais (teste de penetração em oócito *zona free* de hamster, teste de expansão hipo-osmótica e teste de penetração em hemi-zona homóloga), permitiu uma predição satisfatória da fertilidade da amostra (77,6% de acerto), isto é, uma alta porcentagem de acertos, utilizando estas técnicas, para predizer se uma determinada amostra era proveniente de um homem fértil ou infértil.

Brahmkshtri et al. (1999), verificaram que a motilidade espermática pré-congelamento, de amostras seminais de touros cruzados, não apresentou correlação com a taxa de concepção das fêmeas inseminadas utilizando o sêmen pós-descongelado ($r=-0,021$, $p>0,05$).

Vettorato et al. (2002), verificaram ausência de correlação entre motilidade retilínea progressiva e o teste de expansão hipo-osmótico ($r=0,055$, $p=0,63$) em touros *Bos taurus* (Simental) e *Bos indicus* (Nelore) criados a campo, sugerindo que mesmo com a membrana plasmática não íntegra, os espermatozóides podem continuar apresentando motilidade.

Estes resultados ocorrem, provavelmente, devido à: subjetividade, baixa acurácia, imprecisão do método visual utilizado, influência de outros atributos da qualidade espermática na fertilidade, imprecisão da mensuração da fertilidade de ejaculados individuais e influência de fatores não relacionados ao sêmen como a fertilidade da fêmea e estação do ano (HAFEZ, 1995). É importante frisar, porém, que a motilidade retilínea progressiva, pela facilidade de mensuração e correlação significativa com a fertilidade, quando avaliada em conjunto com outras técnicas (SMITH et al., 1981), é um parâmetro importante na avaliação espermática.

6.2 MORFOLOGIA ESPERMÁTICA

Os resultados referentes às variáveis resposta porcentagem de defeitos maiores, porcentagem de defeitos menores e porcentagem de defeitos totais estão descritos nas tabelas 4, 5 e 6.

Tabela 4 - Efeito das raças e estações do ano na porcentagem de defeitos espermáticos maiores, menores e totais, de touros das raças Nelore e Simental, criados a campo, a partir de amostras coletadas em invernos e verões consecutivos - Dourados - Mato Grosso do Sul - 2000/2002

	Nelore	Simental	P*	Inverno	Verão	p**
Defeitos Maiores (%)	10,4 ± 10,5	16,1 ± 14,3	0,03	11,5 ± 11,2	16,3 ± 14,7	0,13
Defeitos Menores (%)	13,7 ± 10,9	12,2 ± 12,0	0,39	12,5 ± 12,8	13,0 ± 10,1	0,44
Defeitos Totais (%)	24,2 ± 12,6	28,3 ± 17,0	0,41	23,9 ± 15,4	29,3 ± 15,2	0,06

* referente à comparação entre as raças (nelore e simental);

** referente à comparação entre as estações do ano (verão e inverno).

Tabela 5 - Efeito das estações do ano em função das raças na porcentagem de defeitos espermáticos maiores, menores e totais, de touros das raças Nelore e Simental, criados a campo, a partir de amostras coletadas em invernos e verões consecutivos. - Dourados - Mato Grosso do Sul - 2000-2002

	Nelore			Simental		
	Inverno	Verão	p*	Inverno	Verão	p**
Defeitos Maiores (%)	10,6 ± 9,8	10,0 ± 11,69	0,64	12,1 ± 12,2	20,3 ± 15,3	0,02
Defeitos Menores (%)	10,2 ± 7,5	17,3 ± 12,8	0,16	14,1 ± 15,4	10,3 ± 6,9	0,89
Defeitos Totais (%)	20,8 ± 10,6	27,4 ± 13,9	0,17	26,0 ± 17,8	30,6 ± 16,2	0,17

* referente à comparação entre inverno e verão dos touros da raça Nelore;

** referente à comparação entre inverno e verão dos touros da raça Simental.

Tabela 6 - Efeito da raça em função das estações do ano na porcentagem de defeitos espermáticos maiores, menores e totais, de touros das raças Nelore e Simental, criados a campo, a partir de amostras coletadas em invernos e verões consecutivos - Dourados - Mato Grosso do Sul - 2000-2002

	Inverno			Verão		
	Nelore	Simental	p*	Nelore	Simental	p**
Defeitos Maiores (%)	10,6 ± 9,8	12,1 ± 12,2	0,74	10,0 ± 11,6	20,3 ± 15,3	0,009
Defeitos Menores (%)	10,2 ± 7,5	14,1 ± 15,4	0,97	17,3 ± 12,8	10,3 ± 6,9	0,14
Defeitos Totais (%)	20,8 ± 10,6	26,0 ± 17,8	0,58	27,4 ± 13,9	30,6 ± 16,2	0,56

* referente à comparação entre Nelore e Simental apenas no inverno;

** referente à comparação entre Nelore e Simental apenas no verão..

A morfologia espermática é uma variável importante para se avaliar a qualidade espermática. Em bovinos, são utilizadas diferentes classificações de anormalidades espermáticas. Em alguns sistemas, os espermatozóides são classificados de acordo com a origem presumível da anormalidade, isto é, os defeitos primários são aqueles que se originam ainda no testículo, enquanto que os defeitos secundários se originam após a saída do testículo (BLOM, 1950). A utilização deste tipo de classificação tem sido questionada. Um sistema criado por Blom (1973), leva em conta a classificação das anormalidades espermáticas em função de seus prejuízos na fertilidade. Assim, neste sistema, as anormalidades espermáticas são classificadas como defeitos maiores ou menores.

No presente experimento, a variável resposta porcentagem de defeitos espermáticos maiores foi menor nos touros da raça Nelore em relação aos touros da raça Simental ($10,36 \pm 10,59$ e $16,16 \pm 14,31\%$, respectivamente; $p=0,0338$). Em relação às duas estações do ano analisadas, não houve diferenças estatisticamente significantes entre verão e inverno ($16,31 \pm 14,74$ e $11,57 \pm 11,26\%$, respectivamente; $p=0,1348$) (Tabela 4). Porém, ao analisar-se separadamente os efeitos da estação do ano sobre as porcentagens de defeitos maiores dentro das diferentes raças, observou-se que nos touros nelore os valores encontrados durante o verão e o inverno não diferiram estatisticamente ($10,05 \pm 11,69$ e $10,65 \pm 9,80\%$,

respectivamente; $p=0,6458$), enquanto que, nos touros da raça Simental, houve maior porcentagem de defeitos maiores nos meses de verão em relação aos meses de inverno ($20,32 \pm 15,30$ e $12,17 \pm 12,27\%$, respectivamente; $p=0,0288$) (Tabela 5). Comparando-se as raças em cada estação separadamente, observou-se que os touros Simental apresentaram maior porcentagem de defeitos maiores em relação aos touros Nelore apenas no verão ($20,32 \pm 15,30$ e $10,05 \pm 11,69\%$, respectivamente, $p=0,0099$) (Tabela 6).

Em relação à variável resposta porcentagem de defeitos espermáticos menores, não se verificou efeito de raças ($13,67 \pm 10,91$ e $12,24 \pm 12,01\%$ para Nelore e Simental, respectivamente; $p=0,3939$) ou de estações do ano ($13,07 \pm 10,15$ e $12,55 \pm 12,87\%$, para verão e inverno respectivamente; $p=0,4405$) (Tabela 4). Da mesma forma, quando comparados os comportamentos de cada raça nas diferentes estações, ou das estações do ano dentro de cada raça não foram observadas diferenças estatísticas (Tabela 5 e 6).

A análise de variância realizada para a variável porcentagem de defeitos espermáticos totais, que corresponde à somatória das porcentagens de defeitos maiores e defeitos menores, apresentou uma tendência estatística para o efeito de estação do ano ($p=0,0576$), com o verão apresentando valores maiores em relação ao inverno ($29,39 \pm 15,27$ e $23,98 \pm 15,43\%$, respectivamente). Por outro lado, não houve efeito de raça ($p=0,4177$) ou da interação entre raças e estações do ano ($p=0,9844$).

Estes resultados sugerem uma influência deletéria das altas temperaturas do verão, nos padrões morfológicos dos espermatozóides, apenas nos touros da raça Simental, sendo que nos touros Nelore não houve influência das estações do ano nesta variável. Esta influência deletéria foi responsável, principalmente, pelos defeitos que causam maiores prejuízos à fertilidade, podendo sugerir uma menor fertilidade dos touros da raça Simental nos meses mais quentes do ano (verão), tanto em relação aos meses mais frios, como em relação aos touros Nelore.

Resultados da análise dos dados referentes às anormalidades espermáticas foram semelhantes aos encontrados por vários autores, que obtiveram indicativos do efeito da estação do ano influenciando diferentemente nas anormalidades espermáticas de touros *Bos indicus* e *Bos taurus*.

Kumi-Dianka et al. (1981), observaram efeitos da estação do ano sobre a morfologia espermática apenas nos touros *Bos taurus* criados na região tropical da Nigéria setentrional, sendo as porcentagens de defeitos espermáticos de cabeça e peça intermediária maiores nos meses de verão em relação ao inverno ($p < 0,05$). Neste experimento, os touros *Bos indicus* não apresentaram diferenças significantes nas porcentagens de anormalidades espermáticas ao longo do ano ($p > 0,05$).

Chacón et al. (1999), verificaram maiores porcentagens de defeitos de cabeça e de peça intermediária em touros *Bos taurus* e touros cruzados *Bos taurus* X *Bos indicus*, quando comparadas com as encontradas nos touros *Bos indicus* ($p < 0,01$).

Resultados obtidos por alguns autores, que compararam touros de origem zebuína e touros de origem européia, sugerem que touros *Bos indicus* possuem maiores porcentagens de anormalidades espermáticas, quando comparados com touros *Bos taurus* (CHENOWETH et al., 1996a,b; FIELDS et al., 1979; FIELDS et al., 1982). Porém, estes autores, avaliaram apenas animais jovens, sendo que estes resultados podem estar relacionados à menor precocidade sexual observada nos animais *Bos indicus*.

6.3 SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

Os resultados referentes à variável resposta concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) estão descritos nas tabelas 7, 8 e 9.

Tabela 7 - Efeito das raças e das estações do ano nas concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), das amostras seminais de touros das raças Nelore e Simental, criados a campo, coletadas em invernos e verões consecutivos - Dourados - Mato Grosso do Sul - 2000-2002

	Nelore	Simental	p*	Inverno	Verão	p**
TBARS (ng/mL)	512,1 ± 358,7	630,9 ± 522,8	0,48	423,7 ± 410,6	728,1 ± 462,5	0,004

* referente à comparação entre as raças (Nelore e Simental);

** referente à comparação entre estações do ano (inverno e verão).

Tabela 8 - Efeito das estações do ano, em função das raças, nas concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), das amostras seminais de touros das raças Nelore e Simental, criados a campo, coletadas em invernos e verões consecutivos - Dourados - Mato Grosso do Sul - 2000-2002

	Nelore			Simental		
	Inverno	Verão	p*	Inverno	Verão	p**
TBARS (ng/mL)	430,2 ± 390,9	583,0 ± 324,9	0,12	419,3 ± 434,1	842,6 ± 527,9	0,006

* referente à comparação entre inverno e verão dos touros da raça Nelore;

** referente à comparação entre inverno e verão dos touros da raça Simental.

Tabela 9 - Efeito das raças, em função das estações do ano, nas concentrações de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), das amostras seminais de touros das raças Nelore e Simental, criados a campo, coletadas em invernos e verões consecutivos - Dourados - Mato Grosso do Sul - 2000-2002

	Inverno			Verão		
	Nelore	Simental	p*	Nelore	Simental	p**
TBARS (ng/mL)	430,2 ± 390,9	419,3 ± 434,1	0,94	583,0 ± 324,9	842,6 ± 527,9	0,06

* referente à comparação entre Nelore e Simental apenas no inverno;

** referente à comparação entre Nelore e Simental apenas no verão.

Analisando-se os dados de todos os animais, verificou-se que não houve diferenças entre os touros da raça Nelore e Simental ($p=0,4815$) em relação à variável concentração de TBARS ($512,08 \pm 358,74$ e $630,98 \pm 522,80$ ng/mL, respectivamente). Quanto ao efeito das estações do ano, as concentrações de TBARS foram maiores no verão quando comparadas com os valores encontrados no inverno ($728,11 \pm 462,58$ e $423,75 \pm 410,63$ ng/mL, respectivamente; $p=0,004$). Levando-se em conta os efeitos das estações do ano nas concentrações de TBARS de cada raça separadamente, verificou-se que os touros da raça

Nelore não apresentaram diferenças significativas ($p=0,1183$) entre verão e inverno ($583,01 \pm 324,98$ e $430,24 \pm 390,90$ ng/mL, respectivamente). Por outro lado, nos touros da raça Simental, estas concentrações foram significativamente maiores nos meses de verão ($p=0,006$) em relação aos meses de inverno ($842,66 \pm 527,98$ e $419,30 \pm 434,14$ ng/mL respectivamente).

Foi encontrada correlação ($r=0,39$, $p=0,0035$) entre os níveis de TBARS e os defeitos de forma de cabeça espermática (estreita na base, piriforme e contorno anormal), indicando que quanto maiores os níveis de TBARS, ocorrerão maiores porcentagens desses defeitos.

A comparação entre os resultados obtidos no presente experimento e os resultados obtidos por outros pesquisadores torna-se complicada visto que poucos são os estudos sobre os níveis de TBARS no sêmen de touros, sendo que a maioria deles, objetiva verificar o efeito protetor de antioxidantes nos níveis de peroxidação lipídica induzida pelo sistema sulfato de ferro + ácido ascórbico ou pelo sistema xantina/xantina oxidase. Além disto, como no espermatozóide a peroxidação lipídica ocorre, principalmente, ao nível da membrana espermática, as concentrações encontradas de TBARS, quando a peroxidação lipídica é induzida, dependem do número de células presentes. Nestes casos, os níveis são expressos geralmente utilizando-se a concentração espermática como denominador, isto é, a quantidade de TBARS gerada por uma certa quantidade de células espermáticas (BECONI et al., 1991; O'FLAHERTY et al., 1997; SCHÖNECK et al., 1996).

Beconi et al. (1991), verificaram que amostras seminais provenientes de touros da raça holandesa, ao serem tratadas com sulfato de ferro e ácido ascórbico, apresentaram uma produção de 500 ng/mL de TBARS no período de duas horas de incubação, sendo que a adição de α -tocoferol reduziu este nível à metade ($p<0,05$).

Resultados semelhantes foram encontrados em experimento realizado por Schöneck et al. (1996), no qual amostra seminais de touros *Bos taurus* foram submetidas ao tratamento com sulfato de ferro e ácido ascórbico para a indução da peroxidação lipídica. Nas amostras

tratadas com este mecanismo oxidante, houve uma produção de cerca de 500ng/mL de TBARS, no intervalo de 60 minutos, o que não ocorreu com as amostras sem a adição do sulfato de ferro e ácido ascórbico, nas quais não houve produção de TBARS no mesmo intervalo de tempo. Neste mesmo experimento verificou-se que amostras tratadas com glutathione redutase não apresentaram menores níveis de peroxidação lipídica induzida. Já as amostras tratadas com a proteína 13 KDa *acidic seminal fluid* (aSFP), apresentaram melhora significativa ($p < 0,0001$). Apesar desta proteína estar presente em concentrações variáveis porém altas no plasma seminal bovino (EINSPANIER et al., 1993), sua função natural no trato genital masculino ainda não foi identificada.

O'Flaherty et al. (1997), verificaram que os níveis de TBARS em touros da raça holandesa, obtidos com a peroxidação induzida pelo sistema sulfato de ferro + ácido ascórbico, foram menores quando as amostras foram tratadas com α -tocoferol (6.160 ± 900 e $9.470 \pm 1.200\text{ng}/10^8$ espermatozóides, respectivamente; $p < 0,05$).

Um fator que poderia influenciar nos níveis de TBARS verificados no presente experimento, seria a frutose, fonte de energia do espermatozóide bovino, que reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Em bovinos, a concentração de frutose no sêmen possui padrão sazonal, o que poderia influenciar nos resultados encontrados para a variável concentração de TBARS, que foi maior no verão para os touros da raça Simental em relação ao inverno e aos da raça Nelore. Porém, estudos de Fields et al. (1979), em touros *Bos taurus* e *Bos indicus* da Flórida, e Igboeli e Rakha (1971), em touros *Bos indicus* da Índia, verificaram que, nos meses mais quentes, os níveis de frutose diminuem significativamente.

Até o presente momento não há literatura disponível no que se refere aos níveis de peroxidação lipídica espontânea normais medidos através da reação com o ácido tiobarbitúrico em touros, porém, em experimento conduzido por Jones e Mann (1977), os níveis de TBARS de amostras seminais de carneiros Suffolk, nas quais não houve a indução

da peroxidação lipídica, foram semelhantes aos encontrados no presente experimento para os animais *Bos indicus* (510ng/ml). Neste mesmo experimento, os níveis de peroxidação lipídica induzida pelo sistema sulfato de ferro + ácido ascórbico, nas amostras espermáticas incubadas por uma hora, foi de 17.000ng/ml. Este resultado porém, pode estar ligado à maior concentração espermática observada nesta espécie.

Os resultado obtidos para a variável níveis de TBARS permitem sugerir que houve um maior índice de peroxidação lipídica espontânea nos touros *Bos taurus* nos meses de verão, quando comparados com os índices obtidos no inverno, indicando que a menor qualidade espermática e a menor fertilidade observadas nestes animais em regiões quentes, podem estar relacionadas à um maior índice de peroxidação lipídica. Já os animais *Bos indicus*, não apresentaram variações sazonais nos níveis de TBARS, sugerindo uma maior resistência à peroxidação lipídica, ou por menor produção de EROs ou por mecanismos antioxidantes mais eficientes.

A correlação positiva encontrada entre os níveis de TBARS e os defeitos de forma de cabeça sugere que a peroxidação lipídica pode ter ocorrido, em maiores níveis, durante a espermatogênese.

Em experimento com sêmen humano, Gil-Guzman et al. (2001) encontrou correlação entre os níveis de EROs e a porcentagem de defeitos de cabeça ($R^2 = 0,64$, $p < 0,05$), sendo que nas amostras com maiores porcentagens de defeitos de cabeça, houve maior produção de EROs.

Um dos mecanismos conhecidos que explicariam a influência deletéria de altas temperaturas na espermatogênese seria a ativação do p53, um gene que tem ação na supressão de tumores, e que é expresso no testículo (ALMON et al., 1993; DADA et al., 2001). Altas temperaturas escrotais causariam, em espermatócitos paquítenos e espermátides arredondadas, a condensação na cromatina nuclear, que, por sua vez, levariam à ativação do p53 e posterior

e conseqüente interrupção do ciclo celular. Este mecanismo visaria prevenir a proliferação de células germinativas com DNA danificado. Morgentaler et al. (1999), postularam que o p53 poderia atuar na apoptose induzida pelo estresse térmico, com a função de selecionar as células germinativas que sofreram danos induzidos pelo calor, provocando a morte celular das mesmas. Segundo Hikim e Swerdloff (1999), o mecanismo de ação do p53 no testículo ainda não foi completamente elucidado, porém, há indícios de que este mecanismo envolveria a ativação de genes indutores do p53 com posterior formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Estas EROs provocariam a degeneração oxidativa de componentes mitocondriais, o que permitiria a liberação de fatores indutores da apoptose, como o citocromo c. Além deste mecanismo, estudo recentes indicam que a proteína p53 promove uma permeabilidade transitória na membrana mitocondrial através da ativação de membros pró-apoptóticos da família bcl-2, o que por si só, permitiria a saída de EORs e do citocromo c (PENTIKÄINEN, 2002). Além de induzir a apoptose no citosol, o citocromo c é um acceptor final de elétrons, com potencial função na formação de ânions superóxido, espécie reativa de oxigênio que fornece substrato para a formação do peróxido de hidrogênio, com posterior formação do radical hidroxila, espécie reativa de oxigênio extremamente ativa (LEHNINGER et al., 1997).

6.4 NÍVEIS DE ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

6.4.1 Catalase

No presente experimento não foi possível verificar a presença de catalase nas amostras de sêmen dos touros das raças Nelore e Simental, em nenhuma das coletas.

Bilodeau et al. (2000), verificaram que espermatozóides bovinos, selecionados por gradiente de Percoll, não produziram níveis detectáveis de catalase. Neste estudo, os pesquisadores também verificaram que o congelamento foi responsável por uma diminuição nos níveis espermáticos de glutathione reduzida (GSH) e de superóxido dismutase, sugerindo que as EROs podem atuar na diminuição da qualidade espermática pós-congelamento.

Lenzi et al. (2000), discutem que a presença de catalase detectada no sêmen, mostrada em material colhido de homens, pode ocorrer devido à contaminação das amostras com neutrófilos, células reconhecidamente ricas nesta enzima, o que explicaria os diferentes resultados encontrados em amostras seminais humanas por vários pesquisadores, cujos estudos não consideravam o grau de pureza das amostras em, relação aos neutrófilos.

Aitken et al. (1992), afirmam que os espermatozóides humanos são especialmente vulneráveis à peroxidação lipídica, causada pelo H_2O_2 , devido às baixas concentrações endógenas de catalase e glutathione peroxidase.

Na análise das amostras, utilizando o ensaio enzimático, encontrou-se sempre o teor de catalase como sendo zero, ou seja, ausência da molécula de enzima ou ausência de atividade da mesma, ou mesmo de substâncias que possuíssem atividade enzimática semelhante a da catalase.

6.4.2 Superóxido dismutase (SOD)

Os resultados referentes à variável resposta nível de atividade da enzima superóxido dismutase estão descritos nas tabelas 10, 11 e 12.

Tabela 10 - Efeito das raças e das estações do ano nos níveis de atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), das amostras seminais de touros das raças Nelore e Simental, criados a campo, coletadas em invernos e verões consecutivos - Dourados - Mato Grosso do Sul - 2000-2002

	Nelore	Simental	p*	Inverno	Verão	p**
Superóxido Dismutase – SOD (U/mL)	43,2 ± 29,4	46,0 ± 34,6	0,83	49,0 ± 32,7	40,3 ± 31,4	0,21

* referente à comparação entre as raças (Nelore e Simental);

** referente à comparação entre estações do ano (inverno e verão).

Tabela 11 - Efeito das estações do ano em função das raças nos níveis de atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), das amostras seminais de touros das raças Nelore e Simental, criados a campo, coletadas em invernos e verões consecutivos - Dourados - Mato Grosso do Sul - 2000-2002

	Nelore		p*	Simental		p**
	Inverno	Verão		Inverno	Verão	
Superóxido Dismutase – SOD (U/mL)	47,9 ± 29,6	38,9 ± 29,3	0,29	49,8 ± 35,4	41,5 ± 33,9	0,39

* referente à comparação entre inverno e verão dos touros da raça Nelore;

** referente à comparação entre inverno e verão dos touros da raça Simental.

Tabela 12 - Efeito das raças em função das estações do ano nos níveis de atividade da enzima superóxido dismutase (SOD), das amostras seminais de touros das raças Nelore e Simental, criados a campo, coletadas em invernos e verões consecutivos - Dourados - Mato Grosso do Sul - 2000-2002

	Inverno		p*	Verão		p**
	Nelore	Simental		Nelore	Simental	
Superóxido Dismutase – SOD (U/mL)	47,9 ± 29,6	49,8 ± 35,4	0,85	38,9 ± 29,3	41,5 ± 33,9	0,92

* referente à comparação entre Nelore e Simental apenas no inverno;

** referente à comparação entre Nelore e Simental apenas no verão.

Não houve efeito das raças ou das estações do ano sobre os níveis de superóxido dismutase nas amostras seminais ($p=0,2106$ e $p=0,2928$, respectivamente; Tabela 10). Também, quando comparadas as estações em função de cada raça separadamente, ou as raças dentro de cada estação separadamente, não houve diferenças estatísticas (Tabelas 11 e 12).

Foi encontrada correlação negativa entre os níveis de SOD e a porcentagem de defeitos primários ($r=-0,3071$, $p=0,0115$), indicando que amostras com maiores níveis de SOD apresentavam menores porcentagens de defeitos espermáticos ligados à espermatogênese. Houve também, correlações negativas entre os níveis de SOD e as porcentagens de defeitos de peça intermediária ($r=0,28725$, $p=0,0167$) e de microcefalia ($r=-0,27807$, $p=0,0207$), sugerindo que amostras com maiores níveis de SOD, apresentavam menores porcentagens destes defeitos.

A comparação dos níveis de SOD encontrados no presente experimento com resultados obtidos, em bovinos, por outros pesquisadores, a exemplo dos níveis de TBARS, torna-se complicada devido à unidade utilizada e à limitada literatura. Resultados obtidos por outros pesquisadores expressam os níveis de SOD através da sua atividade enzimática por uma certa quantidade de células espermáticas (BECONI et al., 1991; O'FLAHERTY et al., 1997; SCHÖNECK et al., 1996). O emprego desta unidade pode ser explicada pela utilização dos níveis de peroxidação lipídica induzida (TBARS) pelo sistema sulfato de ferro + ácido ascórbico, que, para a determinação da concentração, também utiliza como denominador, a quantidade de células presentes. Além disto, nestes experimentos, os níveis de SOD foram obtidos dos sedimentos das amostras após centrifugação, isto é, apenas os provenientes das células espermáticas. Visto que, no presente experimento, os níveis de peroxidação lipídica, foram quantificados através da quantidade de TBARS por mililitro de plasma seminal, utilizou-se o mesmo parâmetro para os níveis de SOD.

Mennella e Jones (1980), verificaram níveis em torno de $269\text{U}/10^{10}$ espermatozóides. Neste experimento os autores observaram que, com o choque frio, 80 a 90% da SOD intracelular é liberada, sendo possível dosá-la no plasma seminal. Também neste experimento, os autores verificaram que tanto a SOD intra como a extracelular, não preveniram contra a

peroxidação lipídica induzida pelo sistema sulfato de ferro + ácido ascórbico, indicando que a SOD não é um intermediário essencial neste sistema.

Beconi et al. (1991), demonstraram que o nível de SOD em amostras seminais de touros raça holandesa foi de $227\text{U}/10^{10}$ espermatozóides, sendo que 28% deste total correspondia à atividade de SOD mitocondrial. Neste experimento os autores também verificaram que a adição de α -tocoferol, provocou uma menor diminuição da atividade de SOD e menores níveis de TBARS, em amostras incubadas por uma hora, em relação às amostras incubadas sem o α -tocoferol, indicando que com a presença deste antioxidante, menos SOD seria necessária para a prevenção da peroxidação lipídica.

Beorlegui et al. (1997), verificaram os níveis de SOD em amostras seminais de touros, divididos em grupos de acordo com a motilidade retilínea progressiva. As amostras com maior motilidade apresentaram maiores índices de atividade da SOD em relação as de menor motilidade ($144 \pm 16,48$ e $44 \pm 4,0\text{U}/10^{10}$ espermatozóides, respectivamente; $p < 0,05$). Os autores encontraram uma alta correlação entre a motilidade e os níveis de SOD ($r = 0,92$), indicando que amostras com maior motilidade apresentavam maiores níveis de SOD. Foi encontrada também, correlação negativa entre os níveis de TBARS e os níveis de SOD ($r = -0,74$), indicando que quanto maiores os níveis de SOD, menores os índices de peroxidação lipídica. Porém, estas altas correlações devem ser analisadas com cuidado, pois, neste experimento, foram utilizados apenas quatro touros.

Os níveis encontrados para a enzima superóxido dismutase nas amostras seminais de touros Nelore e Simental ($43,20 \pm 29,44$ e $46,04 \pm 34,58\text{U/mL}$, respectivamente) no presente experimento, foram semelhantes aos encontrados em humanos (ZINI et al., 2000) e aves (SURAI et al., 1998).

Zini et al. (2000), observaram níveis maiores de SOD ($p < 0,05$) em homens inférteis não azoospermicos ($49,1 \pm 1,6\text{U/mL}$), em relação à homens férteis e inférteis azoospermicos

($37,0 \pm 2,8$ e $37,1 \pm 2,4$ U/mL, respectivamente). Os autores sugerem que em um ou mais tecidos nos quais a SOD é expressa (testículo, epidídimo, próstata e vesícula seminal), ocorre maior expressão de SOD em resposta à uma espermatogênese defeituosa, ou à uma deficiência hormonal.

Em estudo de Surai et al. (1998), os níveis de SOD foram verificados no plasma seminal de galos ($46,2 \pm 2,44$ U/mL), perus ($77,71 \pm 2,07$ U/mL), patos ($32,27 \pm 3,11$ U/mL) e gansos ($42,05 \pm 30,6$ U/mL).

Os resultados obtidos, no presente experimento, para a variável resposta níveis de atividade da superóxido dismutase, sugerem que a SOD não foi o fator determinante para os maiores índices de peroxidação lipídica apresentados pelos touros Simental em relação aos touros Nelore, visto que, as duas raças apresentaram níveis semelhantes desta enzima. Além disto, as correlações observadas, sugerem que, em bovinos, a SOD tem atuação antioxidante principalmente durante a espermatogênese, e, mais especificamente, na fase de espermiogênese, na qual as espermátides arredondadas são transformadas em espermatozóides através de uma série de modificações morfológicas progressivas (HAFEZ, 1995). Estes resultados, além da correlação observada entre os níveis de TBARS e defeitos espermáticos de forma de cabeça, sugerem que, nos touros da raça Simental, houve um maior índice de peroxidação lipídica, provavelmente devido a uma maior produção de EROs, e não a uma deficiência antioxidante. Estes resultados também corroboram a hipótese de que a p53 poderia influenciar neste mecanismo, visto que a mesma atua em resposta ao estresse térmico principalmente em nível de espermatócitos paquítenos e espermátides arredondadas (MORGENTALER et al., 1999), podendo ser este o mecanismo que explicaria a maior produção de EROs, no verão em touros Simental. Porém, os fatores que conferem aos touros Nelore, uma maior resistência a este mecanismo, ainda não foram identificados.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É importante ressaltar que o mecanismo de estresse térmico que afeta os touros não está restrito apenas ao testículo. Além do estresse testicular, ocorre um mecanismo sistêmico hormonal. Concentrações altas de testosterona são necessárias para as funções testiculares e epididimárias normais. O LH estimula as células de Leydig a produzir e secretar testosterona e o FSH age nas células de Sertoli para a produção de proteína ligadora de andrógeno (ABP), responsável pelo aumento nas concentrações de testosterona nos túbulos seminíferos. Com o estresse, há o aumento das concentrações de cortisol, que afetam negativamente a liberação de LH e conseqüentemente a produção de testosterona, interferindo na espermatogênese. (BARTH; BOWMAN, 1994). Porém, nos animais utilizados no presente experimento, não houve diferenças estatisticamente significantes nas concentrações de testosterona no verão ($570,28 \pm 499,86$ e $473,73 \pm 334,17$ ng/ml, para Nelore e Simental, respectivamente; $p=0,7383$) (dados não apresentados).

Os resultados obtidos no presente experimento em relação às análises morfológicas espermáticas, aos níveis seminais de TBARS e aos níveis seminais de SOD, permitem concluir que os touros da raça Simental sofreram maiores índices de peroxidação lipídica em relação aos Nelore, provavelmente, devido às altas temperaturas do verão.

Em humanos, a maioria dos experimentos relacionados ao tratamento para evitar ou diminuir o estresse oxidativo espermático, leva em conta a proteção *in vitro* de amostras já coletadas visando a aplicação de biotécnicas tais como, fertilização *in vitro* e injeção intracitoplasmática (AITKEN et al., 1993a; ARMSTRONG et al., 1999; CALAMERA et al., 2001; GRIVEAU et al., 1995; GRIVEAU; LE LANNOU, 1994; ROLF et al., 1999; TWIGG et al., 1998).

Uma possível aplicação dos resultados positivos obtidos nestes estudos, seria com relação a touros de centrais de inseminação e/ou touros cujo sêmen é manipulado para o emprego na inseminação artificial, na produção de embriões *in vitro* e *in vivo* e em biotécnicas mais recentes como a injeção intra-citoplasmática.

Visto que o enfoque do presente experimento foi em relação aos touros criados a campo e utilizados em sistema de monta natural, uma alternativa de tratamento obrigatoriamente teria que atuar em nível sistêmico.

Em humanos a suplementação oral ainda é especulativa, e depende tanto da exposição do espermatozóide a um estresse oxidativo suficiente para sobrepujar seus mecanismos de defesa, como do aumento dos níveis de antioxidante nos tratos reprodutivos e no espermatozóide em si, que a suplementação oral possa causar (TAYLOR, 2001).

Em animais, o tratamento sistêmico com antioxidantes, como selênio, α -tocoferol, ácido ascórbico (vitamina C), β -caroteno (precursor da vitamina A), Cobre e Zinco, tem sido estudada por diversos autores. O selênio está envolvido na atividade da glutathione peroxidase, que por sua vez reduz os peróxidos presentes no citosol (NORDBERG; ARNÈR, 2001). O α -tocoferol atua na membrana plasmática, como um antioxidante lipo-solúvel, prevenindo a reação oxidativa em cadeia (MATÈS, 2000). Apesar dos diferentes mecanismos de ação, o α -tocoferol e o selênio possuem ação recíproca como moderadores, sendo que um pode reduzir os requerimentos do outro (HURLEY; DOANE, 1989). O ácido ascórbico atua na proteção da atividade do citocromo P-450 da destruição por pseudo-substratos e oxigênio (FRAGA et al., 1991). O β -caroteno, possui ação antioxidante em baixas pressões de oxigênio, removendo moléculas únicas de oxigênio (SNYDER; STUART, 1981). O cobre e o zinco estão envolvidos na atividade da enzima superóxido dismutase, que produz o H_2O_2 partir do O_2^- .

Em touros, as respostas em relação ao tratamento com antioxidantes são contraditórias. Em revisão de Hurley e Doane (1989), os autores discutem que os tratamentos

com selênio e α -tocoferol não apresentaram resultados significativos em relação à melhora dos parâmetros seminais de touros, mesmo quando houve aumento nas concentrações de selênio nos testículos e espermatozóides. Os autores discutem que a eficácia dos tratamentos com selênio e α -tocoferol depende de inúmeros fatores, sendo relevantes principalmente em rebanhos nos quais ocorrem prejuízos na fertilidade devido à deficiência destas substâncias, como em rebanhos criados a campo com pasto de qualidade inferior.

Em relação ao ácido ascórbico, poucas são as informações recentes quanto a sua eficácia como suplemento antioxidante. Estudos sugerem que ele atua no aumento na motilidade retilínea progressiva e na vitalidade espermática em touros (PHILLIPS et al., 1950). Em um estudo com humanos, realizado por Fraga et al. (1991), quando a suplementação com ácido ascórbico foi reduzida de 250 para 5 mg/dia, houve um decréscimo de 50% nos níveis desta substância no plasma seminal. Além disso, houve um aumento de 91% no número de espermatozóides com danos de DNA.

As condições de campo nas quais o presente experimento foi realizado correspondem à realidade do manejo empregado na maior parte das propriedades voltadas à pecuária de corte no Brasil. Chenoweth (2000) afirma que as perdas relacionadas à fertilidade na pecuária de corte são dez vezes maiores que as relacionadas à qualidade de carcaça e cinco vezes maiores que as relacionadas ao desempenho em ganho de peso.

Quando ocorre nos touros, a infertilidade ou a subfertilidade torna-se ainda mais importante, tanto pela dificuldade em se identificar estes touros na criação extensiva, como pelas potenciais perdas relacionadas a um reprodutor infértil. Segundo Carrilo (1988) quando uma vaca falha ao reproduzir-se por qualquer razão, perde-se um bezerro. Quando um touro falha, há uma perda potencial de 25 a 50 bezerros para cada 100 vacas.

Assim, o desenvolvimento de tratamentos capazes de diminuir os efeitos do estresse térmico em touros não adaptados é de extrema importância para a pecuária de corte nacional.

Visto que, resultados obtidos no presente experimento sugerem que nos touros *Bos taurus* houve um maior índice de estresse oxidativo nos meses mais quentes em relação aos *Bos indicus*, a terapia antioxidante torna-se uma alternativa viável para a diminuição deste efeito deletério. Porém, mais estudos são necessários para se verificar a eficácia de cada um dos possíveis tratamentos antioxidantes.

7 CONCLUSÕES

- No inverno, os touros da raça Nelore, apresentaram maior motilidade retilínea progressiva em relação aos touros Nelore na mesma época.
 - Os touros da raça Simental apresentaram maior porcentagem de defeitos espermáticos maiores em relação aos touros da raça Nelore. No verão, os touros da raça Simental apresentaram maiores porcentagens de defeitos espermáticos maiores em relação aos valores apresentados no inverno e aos valores apresentados pelos touros Nelore, tanto no inverno como no verão.
 - Não houve efeito de raça ou de estações do ano em relação às porcentagens de defeitos espermáticos menores e totais.
 - Os touros da raça Simental (*Bos taurus taurus*), apresentaram maiores concentrações seminais de TBARS no verão em relação aos valores apresentados pelos mesmos no inverno e aos valores apresentados pelos touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), tanto no verão como no inverno, indicando um maior índice de peroxidação lipídica dos animais taurinos, em relação aos zebuínos.
 - Não foi possível verificar a presença da enzima antioxidante catalase, nas amostras seminais dos touros Nelore e Simental, tanto no verão como no inverno.
-

- Não houve efeito de raça ou de estações do ano nos níveis de atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase

REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; IKEMOTO, I.; LOUGHLIN, K. R. Relationship of sperm parameters with levels of reactive oxygen species in semen specimens. **Journal of Urology**, v. 152, p. 107-110, 1994.

AGRAWAL, Y. P.; VANHA-PERTTULA, T. Glutathione, L-Glutamic acid and gamma-glutamyl transpeptidase in the bull reproductive tissues. **International Journal of Andrology**, v. 11, p. 123-131, 1988.

AITKEN, R. J. A free radical theory of male infertility. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 6, p. 19-24, 1994.

AITKEN, R. J.; BARKER, M. A. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma. **International Journal of Andrology**, v. 25, p. 191-194, 2002.

AITKEN, R. J.; BUCKINGHAM, D. W.; CARRERAS, A.; IRVINE, D. S. Superoxide dismutase in human sperm suspensions: relationship with cellular composition, oxidative stress, and sperm function. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 21, n. 4, p. 495-504, 1996.

AITKEN, R. J.; BUCKINGHAM, D. W.; HARKISS, D. Use of xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 97, p. 441-450, 1993a.

AITKEN, R. J.; BUCKINGHAM, D. W.; WEST, K.; WU, F. C.; ZIKOPOULOS, K.; RICHARDSON, D. W. Differential contribution of leucocytes and spermatozoa to the high levels of reactive oxygen species recorded in the ejaculates of oligozoospermic patients. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 94, p. 451-462, 1992.

AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 81, p. 459-469, 1987a.

AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S. Generation of reactive oxygen species by human spermatozoa. In: DROMANDY, T.; RICE-EVANS, C. (Eds), **Free Radicals: Recent**

Developments in Lipid Chemistry, Experimental Pathology and Medicine. Londres: Richelieu Press, 1987b, p. 333-335.

AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparations techniques **Journal of Andrology**, v. 9, p. 367-376, 1988.

AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S.; FISHEL, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 183-197, 1989a.

AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S.; HARGREAVE, T. B.; IRVINE, D. S.; WU, F. C. Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in cases of oligozoospermia. **Journal of Andrology**, v. 10, p. 214-220, 1989b.

AITKEN, R. J.; FISHEL, H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. **Bioassays**, v. 16, p. 259-267, 1994.

AITKEN, R. J.; GORDON, E.; HARKISS, D.; TWIGG, J. P. ; MILNE, P.; JENNINGS, J.; IRVINE, D. S. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 1037-1046, 1998.

AITKEN, R. J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. W. Analysis of lipid peroxidation mechanisms in human spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 35, p. 302-315, 1993b.

AITKEN, R. J.; HARKISS, D.; BUCKINGHAM, D. W. Relationship between iron-catalysed lipid peroxidation potential and human sperm function. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, p. 257-265, 1993c.

AITKEN, R. J.; IRVINE, D.S.; WU, F. C. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 164, p. 542-551, 1991.

ALMON, E.; GOLDFINGER, N.; KAPON, A.; SCHWARTZ, D.; LEVINE, A. J.; ROTTER, V. Testicular tissue specific expression of p53 suppressor gene. **Developmental Biology**, v. 153, p. 107-116, 1993.

ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. **Biology of Reproduction**, v. 29, p. 548-555, 1983.

ALVAREZ, J. G.; TOUCHSTONE, J. C.; BLASCO, L.; STOREY, B. T. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. **Journal of Andrology**, v. 8, p. 338-348, 1987.

ARMSTRONG, J. S.; RAJASEKARAN, M.; CHAMULITRAT, W.; GATTI, P. ; HELLSTROM, W. J.; SIKKS, S. C. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 7/8, p. 869-880, 1999.

ARTHUR, P. F.; HEARNshaw, H.; STEPHENSON, F. Direct maternal additive and heterosis effects from crossing *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle: cow and calf performance in two environments. **Livestock Production Science**, v. 57, p. 231-21, 1999.

ASBIA. **Relatório Estatístico 2001**. Evolução da inseminação artificial - 1995 a 2001. Disponível em : <<http://www.asbia.org.br/setrelat.html>>. Acesso em: 24 jan. 2003.

AZIZ, N.; BUCHAN, I.; TAYLOR, C.; LINGSLAND, C. R.; LEWIS-JONES, I. The sperm deformity index: a reliable predictor of the outcome of oocyte fertilization *in vitro*. **Fertility and Sterility**, v. 66, p. 1000-1008, 1996.

BARTH, A. D.; BOWMAN, P. A. The sequential appearance of sperm abnormalities after scrotal insulation or dexamethasone treatment in bulls. **Canadian Veterinary Journal**, v. 34, p. 93-102, 1994.

BECONI, M. T.; AFFRANCHINO, M. A.; SCHAND, L. M.; BEORLEGUI, N. B. Influence of antioxidants on SOD activity in bovine sperm. **Biochemistry International**, v. 23, n. 3, p. 545-553, 1991.

BENOV, L.; FRIDOVICH, I. Growth in iron-enriched medium partially compensates *E. coli* for the lack of Mn and Fe. **Journal of Biological Biochemistry**, v. 273, p. 10313-10316, 1988.

BEORLEGUI, N.; CETICA, P. ; TRINCHERO, G.; CÓRDOBA, M.; BECONI, M. Comparative study of functional and biochemical parameters in frozen bovine sperm. **Andrologia**, v. 29, p. 37-42, 1997.

BILODEAU, J. F.; CHATTERJEE, S.; SIRARD, M. A.; GAGNON, C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction Development**, v. 55, n. 3, p. 282-288, 2000.

BLAKE, D. R.; ALLEN, R. E.; LUNEC, J. Free radical in biological systems - a review oriented to inflammatory processes. **British Medical Bulletin**, v. 43, p. 371-385, 1987.

BLOM, E. Interpretation of spermatic cytology in bulls. **Fertility and Sterility**, v. 1, p. 223-238, 1950.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristics sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordisk Veterinaer Medicin.**, v. 25, n. 7, p. 383-391, 1973.

BRAHMKSHTRI, B. P. ; EDWIN, M. J.; JOHN, M. C.; NAINAR, A. M.; KRISHNAN, A. R. Relative efficacy of conventional sperm parameters and sperm penetration bioassay to assess bull fertility in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 54, p. 159-168, 1999.

BRITO, L. F. C.; SILVA, A. E. D. F.; RODRIGUES, L. H.; VIEIRA, F. V.; DERAGON, L. A. G.; KASTELIC, J. P. Effects of environmental factors, age and genotype on sperm production and semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* AI bulls in Brazil. **Animal Reproduction Science**, v. 70, p. 181-190, 2002.

BURROW, H. M. The effects of inbreeding on productive and adaptive traits and temperament of tropical beef cattle. **Livestock Production Science**, v. 55, p. 227-243, 1998.

CALAMERA, J. C.; FERNANDEZ, P. J.; BUFFONE, M. G.; ACOSTA, A. A.; DONCEL, G. F. Effect of long-term in vitro incubation of human spermatozoa: functional parameters and catalase effect. **Andrologia**, v. 33, n.2, p. 79-86, 2001.

CARRILLO, J. **Manejo de un rodeo de cría**. Buenos Aires: 2ª ed., INTA CERBAS EEA Balcarce, 1998, 194 p.

CARTWRIGHT, T. C. Responses of beef cattle to high ambient temperatures. **Journal of Animal Science**, v. 14, p. 350-362, 1955.

CHACÓN, J.; PÉREZ, E.; MÜLLER, E.; SÖDERQUIST, L.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Breeding soundness evaluation of extensively managed bulls in Costa Rica. **Theriogenology**, v. 52, p. 221-231, 1999.

CHANDOLIA, R. K.; REINERTSEN, E. M.; HANSEN, P. J. Short communication: lack of breed differences in response of bovine spermatozoa to heat shock. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2617-2619, 1999.

CHAUDIERE, J.; WILHELMSSEN, E. C.; TAPPEL, A. L. Mechanism of selenium-glutathione peroxidase and its inhibition by mercaptocarboxylic acid and other mercaptans. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 259, p. 1043-1050, 1984.

CHEMINEAU, P. Medio ambiente y reproduccion animal. **Revue Mondiale de Zootechnie**, v. 77, p. 2-14, 1993/4. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/v1650t/v1650T04.html>>. Acesso em: 02 fev. 2003.

CHENOWETH, P. J. Rational for using bull breeding soundness evaluations. **Compendium of Continuing Education for the Practicing Veterinarians**, v. 22, n.2, p. 48-55, 2000.

CHENOWETH, P. J.; CHASE JR., C. C.; LARSEN, R. E.; THATCHER, M.-J. D.; BIVENS, J. F.; WILCOX, C. J. The assessment of sexual performance in young *Bos taurus* and *Bos indicus* beef bulls. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 48, p. 225-236, 1996a.

CHENOWETH, P. J.; CHASE JR., C. C.; THATCHER, M.-J. D.; WILCOX, C. J.; LARSEN, R. E. Breed and other effects on reproductive traits and breeding soundness categorization in young beef bulls in Florida. **Theriogenology**, v. 46, p. 1159-1170, 1996b.

CNA. **Confederação Nacional da Agricultura**. Disponível em: <<http://www.cna.org.br>>. Acesso em 08 abr. 2003.

DADA, R.; GUPTA, N. P. ; KUCHERIA K. Deterioration of sperm morphology in men exposed to high temperatures. **Journal of Anatomical Society of India**, v. 50, n.2, p. 107-111, 2001.

DE LAMIRANDE, E.; EILEY D.; GAGNON, C. Inverse relationship between the induction of human sperm capacitation and spontaneous acrosome reaction by various biological fluids and the superoxide scavenging capacity of these fluids. **International Journal of Andrology**, v. 16, p. 258-266, 1993.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 14, p. 255-265, 1993.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. **Human Reproduction** v. 10, n.1, p15-21, 1995

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate (ATP) plays an important role in inhibition of sperm motility. **Journal of Andrology**, v. 13, p. 379-386, 1992.

DE 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.

DONELLY, E. T.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. **Fertility and Sterility**, v. 72, p. 484-495, 1999.

DUBLIN, L.; HOTCHKISS, R. S. Testis biopsy in subfertile men with varicocele. **Fertility and Sterility**, v. 20, n 1, 1969.

EINSPANIER, R.; AMSELGRUBER, W.; SINOWATZ, F.; RÖPKE, R.; SCHAMS, D. Localization and concentration of a new bioactive acidic seminal fluid protein (aSFP) in bulls (*Bos taurus taurus*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, p. 241-244, 1993.

ENGEL, S; SCHREINER, T; PETZOLDT, R. Lipid peroxidation in human spermatozoa and maintenance of progressive sperm motility. **Andrologia**, v. 31, n.1, p. 17-22, 1999.

ENGHILD, J. J.; THOGERSEN, I. B.; OURY, T. D.; VALNICKOVA, Z.; HOJRUP, P; CRAPO, J. D. The heparin-binding domain of Ec-SOD is proteolytically processed intracellularly during biosynthesis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 14818-14822, 1999.

ESTAÇÃO AGROCLIMATOLÓGICA DA EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE (EMBRAPA - CPAO) **Publicação eletrônica** [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <mnichi@usp.br> em 07 jan. 2003.

EUCLIDES FILHO, K. **O melhoramento genético e os cruzamentos em bovino de corte**. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 1996. 35 p. (EMBRAPA-CNPGC. Documentos, 63). Disponível em: <<http://www.cnpqc.embrapa.br/publicacoes/doc/doc63/>>. Acesso em: 10 jan. 2003.

FAO **Food and Agriculture Organization**, 2001. Disponível em: < <http://www.fao.org>>. Acesso em: 24 jan 2003.

FIELDS, M. J.; BURNS, W. C.; WARNICK, A. C. Age, season and breed effects on testicular volume and semen traits in young beef bulls. **Journal of Animal Science**, v. 48, n. 6, p. 1299-1304, 1979.

FIELDS, M. J.; HENTGES JR., J.F.; CORNELISSE, K.W. Aspects of the sexual development of Brahman versus Angus bulls in Florida. **Theriogenology**, v. 18, p. 17-31, 1982.

FINCH, V. A. Heat as a stress factor in herbivores under tropical conditions. In: GILCHRIST, F. M. C. & MACKIE, R. I. **Herbivore nutrition in the subtropics and tropics**. Craighall, South Africa: The Science Press, 1984, p. 89-104.

FLOHÉ, L.; ÖTTING, F. Formation or removal of oxygen radicals. **Methods in Enzimology**, v. 105, p. 92-104., 1984,

FRAGA, G. G.; MOTCHNIK, P. A.; SHIGENAGA, M. K.; HELBROCK, J. H.; JACOB, R. A.; AMES, B. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States**, v. 88, p. 11003-11006, 1991.

GIL-GUZMAN, E.; OLLERO, M.; LOPEZ, M. C.; SHARMA, R. K.; ALVAREZ, J. G.; THOMAS JR., A. J.; AGARWAL, A. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. **Human Reproduction**, v. 16, n. 9, p. 1922-1930, 2001.

GOMEZ, E.; IRVINE, D. S.; AITKEN, R. J. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. **International Journal of Andrology**, v. 21, p. 81-94, 1998.

GRIVEAU, J. F.; DUMONT, E.; RENARD, P. ; CALLEGARI, J. P. ; LE LANNOU, D. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defence systems in human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 103, p. 17-26, 1995.

GRIVEAU, J. F.; LE LANNOU, D. Effects of antioxidants on human sperm preparation techniques. **International Journal of Andrology**, v. 17, p. 225-231, 1994.

GRIVEAU, J. F.; RENARD, P. ; LE LANNOU, D. An in vitro promoting role for hydrogen peroxide in human sperm capacitation. **International Journal of Andrology**, v. 17, p. 300-307, 1994.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. São Paulo 6.ed., Manole, São Paulo, 1994, 582p.

HALIWELL, B. How to characterize a biological antioxidant. **Free Radical Research Communications**, v. 9, p. 1-32, 1990.

HALLIWELL, B. Antioxidants and human diseases: some new concepts. **The FASEB Journal**, v. 1, p. 358-364, 1987.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. **American Journal of Medicine**, v. 91, p. 14-22, 1991.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: Clarendon Press, 1989, p. 543.

HENDIN, B. N.; KOLETTIS, P. N.; SHARMA, R. K.; THOMAS JR., A. J.; AGARWAL, A. Varicocele is associated with elevated spermatozoal reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity. **Urology**, v. 161, p. 1831-1834, 1999.

HIKIM, A. P. S.; SWERDLOFF, R. S. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. **Reviews of Reproduction**, v. 4, p. 38-47, 1999.

HONIG, S.C.; THOMPSON, S.; LIPSCHULTZ, L. I. Reassessment of male-factor infertility, including the varicocele, sperm penetration assay, semen analysis, and in vitro fertilization. **Current Opinion in Obstetric & Gynecology**, v. 5, p. 245-251, 1993.

IBGE, **Censo agropecuário 1995-1996**, Ministério do Planejamento e Orçamento, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 1988.

IGBOELI, G.; RAKHA, A. M. Seasonal changes in the ejaculate characteristics of Angoni (short horn Zebu) bulls. **Journal of Animal Science**, v. 33, p. 651, 1971.

IMAI, H. ; NARASHIMA, K.; ARAI, M.; SAKAMOTO, H.; CHIBA, N.; NAKAGAWA, Y. Suppression of leucotriene formation in RBL-2H3 cells that overexpressed phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 1990-1997.

IWASAKI, A.; GAGNON, C. Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. **Fertility and Sterility**, v. 57, p. 409-416, 1992.

JANERO, D. J. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity indices of lipid peroxidation and peroxidative injury. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 9, p. 515-540, 1990.

JARROW, J. P. Effects of varicocele on male infertility. **Human Reproduction Update**, v. 7, n.1, p. 59-64, 2001.

JEULIN, C.; SOUFIR, J.C.; WEBER, P. ; LAVAL-MARTIN, D.; CALVAYRAC, R. Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. **Gamete Research**, v. 24, p. 185-196, 1989.

JOHNSTON, J. E., NAELAPAA H., FRYE J. B. Physiological responses of Holstein, Brown Swiss and Red Sindhi crossbred bulls exposed to high temperatures and humidities. **Journal of Animal Science**, v. 22, p. 432-436, 1963.

JONES, R.; MANN, T. Damage to ram spermatozoa by peroxidation of endogenous phospholipids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 50, p. 261-268, 1977

JOW, W. W.; SCHLEGEL, P. N.; CICHON, Z.; PHILIPS, D.; GOLDSTEIN, M.; BARDIN, C. W. Identification and localization of copper-zinc superoxide dismutase gene expression in rat testicular development. **Journal of Andrology**, v. 14, n. 6, p. 439-447, 1993.

KAHI, A. K.; THORPE, W.; NITTER, G.; VAN ARENDONK, J. A. M.; GALL, C. F. Economic evaluation of crossbreeding for dairy production in a pasture based production system in Kenya. **Livestock Production Science**, v. 65, p. 167-184, 2000.

KESPOPOULO, E.; TOMLINSON, M. J.; BARRATT, C. L. R.; BOLTON, A. E.; COOKE, I. D. Origin of reactive oxygen species in human semen: spermatozoa or leucocytes? **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 94, p. 463-470, 1994.

KODAMA, H.; KURIBAYASHI, Y.; GAGNON, C. Effects of sperm lipid peroxidation on fertilization. **Journal of Andrology**, v. 16, p. 151-157, 1996.

KUMI-DIANKA, J.; NAGARATNAM, V.; RWUAAAN, J. S. Seasonal and age-related changes in semen quality and testicular morphology of bulls in a tropical environment. **The Veterinary Record**, v. 3, p. 13-15, 1981.

LAKARI, E. **Expression of oxidant and antioxidant enzymes in human lung and interstitial lung diseases**. 2002, 86p. , Oulu. Academic Dissertation, Faculty of Medicine, University of Oulu, Finlandia, 2002.

LASSO, J. L.; NOILES, E. E.; ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Mechanism of superoxide dismutase loss from human sperm cells during cryopreservation. **Journal of Andrology**, v. 15, n. 3, p. 255-265, 1994.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica.**, São Paulo: Manole, 7ª ed., 1997, 758p.

LENZI, A.; CULASSO, F.; GANDINI, L.; LOMBARDO, F.; DONDERO, F. Placebo-controlled, double-blind, cross-over trial of glutathione therapy, in male infertility. **Human Reproduction**, v. 8, p. 1657-1662, 1993.

LENZI, A.; PICARDO, M.; GANDINI, L.; LOMBARDO, F.; TERMINALI, O.; PASSI, S.; DONDERO, F. Glutathione treatment of dyspermia: effect on the lipoperoxidation process. **Human Reproduction**, v. 9, p. 2044-2050, 1994.

LI, W.; JIANG, Y.; RAJPURKAR, A.; TEFILLI, M. V.; DUNBAR, J. C.; DHABUWALA, C. B. Lipid peroxidation and antioxidant activities in rat testis after chronic cocaine administration. **Urology**, v. 54, n. 5, p. 925-928, 1999.

LLEDÍAS, F.; RANGEL, P. ; HANSBERG, W. Oxidation of catalase by singlet oxygen. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, p. 10630-10637, 1998.

LUNEC, J. Oxygen radicals: their measurement in vivo. **Analytical Proceedings**, v. 26, p. 130-131, 1989.

MACLEOD, J. Seminal cytology in the presence of varicocele. **Fertility and Sterility**, v. 16, n. 6, p. 735-757, 1965.

MATÉS, J. M. Effects of antioxidant enzymes in molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v. 153, p. 83-104, 2000.

MATES, J. M.; PEREZ-GOMEZ, C.; NUNEZ DE CASTRO, I. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clinical Biochemistry**, v. 32, p. 595-603, 1999.

MATHEVON, M.; BUHR, M. M.; DEKKERS, J. C. M. Environmental, management, and genetic factors affecting semen production in Holstein bulls. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 3321-3330, 1998.

MAZZILLI, F.; ROSSI, T.; MARCHESINI, M.; RONCONI, C.; DONDERO, F. Superoxide anion in human semen related to seminal parameters and clinical aspects. **Fertility and Sterility**, v. 62, p. 862-868, 1994.

MENNELLA, M. R.; JONES, R. Properties of spermatozoal superoxide dismutase and lack of involvement of superoxide in metal-ion-catalysed lipid peroxidation and reactions in semen. **Biochemical Journal**, v. 191, p. 289-297, 1980.

MEYERHOEFFER, D. C.; WETTEMANN, R. P. ; COLEMAN, S. W.; WELLS, M. E. Reproductive criteria of beef bulls during and after exposure to increased ambient temperature. **Journal of Animal Science**, v. 60, n. 2, p. 352-357, 1985.

MIESEL, R.; JEDRZEJCZAK, P. ; SANOCKA, D.; KURPISZ, M. K. Severe antioxidant deficiency in human semen samples with pathological spermogram parameters. **Andrologia**, v. 29, p. 77-83, 1997.

MORGENTALER, A.; STAHL, C.; YIN, Y. Testis and temperature. An historical, clinical and research perspective. **Journal of Andrology**, v. 20, p. 189-195, 1999.

MOSTAFA, T.; ANIS, T. H.; EL-NASHAR, A.; IMAN, H.; OTHMAN, I. A. Varicocelectomy reduces reactive oxygen species levels and increases antioxidant activity of seminal plasma from infertile men with varicocele. **International Journal of Andrology**, v. 24, p. 261-265, 2001.

NORDEBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

NOSKE, H. D.; WEIDNER, W. Varicocele - a historical perspective. **World Journal of Andrology**, v. 17, p. 151-157, 1999.

O'FLAHERTY, C. M.; BECONI, M.; BEORLEGUI, N. Effect of natural antioxidants, superoxide dismutase and hydrogen peroxide on capacitation of frozen-thawed bull spermatozoa. **Andrologia**, v. 29, p. 269-275, 1997.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.

OHASHI, O. M.; SOUSA, J. S.; RIBEIRO, H. F. L.; VALE, W. G. Distúrbios reprodutivos em touros *Bos indicus*, *B. taurus* e mestiços criados em clima amazônico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 8, n. 1/2, p. 31-35, 1988.

OLLERO, M.; GIL-GUZMAN, E.; LOPEZ, M. C.; SHARMA, R. K.; AGARWAL, A.; LARSON, K.; EVERSON, D.; THOMAS JR., A. J.; ALVAREZ, J. G. Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. **Human Reproduction**, v. 16, n. 9, p. 1912-1921, 2001.

PARKINSON, T. J. Seasonal variations in semen quality of bulls: Correlations with environmental temperature. **The Veterinary Record**, v. 16, p. 479-482, 1987.

PASQUALOTTO, F. F.; SHARMA, R. K.; KOBAYASHI, H.; NELSON, D. R.; THOMAS JR., A. J.; AGARWAL, A. Oxidative stress in normospermic men undergoing infertility evaluation. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 2, p. 316-322, 2001.

PASQUALOTTO, F. F.; SHARMA, R. K.; NELSON, D. R.; THOMAS JR., A. J.; AGARWAL, A. Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. **Fertility and Sterility**, v. 73, n. 3, p. 459-464, 2000.

PENTIKÄINEM, V. **Regulation of male germ cell apoptosis. Roles of sex steroids and the cellular death receptors Fas and TNFR1**. 2002, 69f. , Helsinki. Academic Dissertation, Medical Faculty of the University of Helsinki, Finlandi, 2002.

PFEIFER, H.; CONRAD, M.; ROETHLEIN, D.; KYRIAKOPOULOS, M. A.; BRIELMEIER, M.; BORNKAMM, G. W.; BEHNE, DIETRICH Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. **The FASEB Journal**, v. 15, n. 7, p. 1236-1238, 2001.

PHILLIPS, P. H.; LARDY, H. A.; HEIZER, E. E.; RUPEL, I. W. Sperm stimulation in the Bull through the subcutaneous administration of ascorbic acid. **Journal of Dairy Science**, v. 23, p. 873, 1950.

PORTO, J. C. A.; EUCLIDES FILHO, K.; SILVA, J. M. da; SILVEIRA, A. C. L. da; ARRUDA, E. F. de. Avaliação do desempenho de diferentes grupos genéticos em confinamento. 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Maringá, 1994, **Anais...**, p. 610., 1994.

RAO, B.; SOUFIR, J.C.; MARTIN, M; DAVID, G. Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. **Gamete Research**, v. 24, p. 127-134, 1989.

RHEMREV, J. P. T.; VERMEIDEN, J. P. W.; HAENEN, G. R. M. M.; DE BRUIJNE, J. J.; REKERS-MOMBARG, L. T. M.; BAST, A. Progressively motile human spermatozoa are well protected against *in vitro* lipid peroxidation imposed by induced oxidative stress. **Andrologia**, v. 33, p. 151-158, 2001.

RICE-EVANS, C. A.; DIPLOCK, A. T.; SYMONS, M. C. R. Techniques in free radical research. **Laboratory Thechniques in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 22, p.260 , 1991.

ROCHA, A.; RANDEL, R. D.; BROUSSARD, J. R.; LIM, J. M.; BLAIR, R. M.; ROUSSEI, J. D.; GODKE, R. A.; HANSEL, W. High enviromental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v. 49, p. 657-665, 1998.

SALEH, R. A.; AGARWAL, A. Oxidative stress and male infertility: From research bench to clinical practice. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 6, p. 737-752, 2002.

SAS. **The Statistical Analyze Systems for Windows V8**. Cary, 1999-2001.

SCHÖNECK, C.; BRAUM, J.; EINSPANIER, R. Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein aSPF: Effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. **Theriogenology**, v. 45, p. 633-642, 1996.

SENGOKU, K.; TAMATE, K.; YOSHIDA, T.; TAKAOKA, Y.; MIYAMOTO, T.; ISHIKAWA, M. Effects of low concentrations of nitric oxide on the zona pellucida binding ability of human spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 69, n. 3, p. 522-527, 1998.

SHARMA, R. K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, v. 48, n. 6, p. 835-850, 1996.

SHARMA, R. K.; PASQUALOTTO, F. F.; NELSON, D. R.; THOMAS JR, A. J.; AGARWAL, A. The reactive oxygen species – total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. **Human Reproduction**, v. 14, n. 11, p. 2801-2807, 1999.

SHEKARRIZ, M.; SHARMA, R. K.; THOMAS JR., A. J.; AGARWAL, A. Positive myeloperoxidase staining (Endtz test) as an indicator of excessive reactive oxygen species in semen. **Journal of Assisted Reproduction & Genetics**, v. 12, p. 70-74, 1995a.

SHEKARRIZ, M.; THOMAS JR., A. J.; AGARWAL, A. Incidence and level of seminal reactive oxygen species in normal men. **Urology**, v. 45, p. 130-107, 1995b.

SIDHU, R. S.; SHARMA, R. K.; THOMAS JR., A. J.; AGARWAL, A. Relationship between creatinine kinase activity and semen characteristics in sub-fertile men. **International Journal of Fertility and Women's Medicine**, v. 43, p. 192-197, 1998.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. **European Journal of Biochemics**. v. 215, p. 213-219, 1993.

SIFFERT FILHO, N.; FAVERET FILHO, P. O sistema agroindustrial de carnes: Competitividade e estruturas de governança. **Revista BNDES**, n 10, p. 1-31, 1998. Disponível em: < <http://www.bndes.gov.br/conhecimento/revista/rev1012.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2003

SIKKA, S. C. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. **Frontiers in Bioscience**, v. 1, p. 78-86, 1996

SLATER, T. F. Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. **Methods in Enzimology**, v. 105, p. 283-293, 1984.

SMITH, M.F.; MORRIS, D.L.; AMOSS, M.S.; PARISH, N.R.; WILLIAMS, J.D.; WILTBANK, J.N. Relationships among fertility, scrotal circumference, seminal quality and libido in Santa Gertrudis bulls. **Theriogenology**, v. 16, p. 379, 1981.

SÖDERQUIST, L.; JASON, L.; HÅÅRD, M.; EINARSSON, S. Influence of season, age, breed and some other factors on the variation in sperm morphological abnormalities in Swedish dairy A. I. bulls. **Animal Reproduction Science**, n. 44, p. 91-98, 1996.

SURAI, P. F.; BLESBOIS, E.; GRASSEAU, I.; CHALAH, T.; BRILLARD, J.P. ; WISHART, G. J.; CEROLINI, S.; SPARKS, N. H. C. Fatty acid composition, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity and total antioxidant activity of avian semen. **Comparative Biochemistry and Physiology**, part B, v. 120, p. 527-533, 1998.

TAYLOR, C. T. Antioxidants and reactive oxygens species in human fertility. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 10, p. 189-198, 2001.

TEODORO, R. L.; MADALENA, F. E.; SMITH, C. The value of F₁ dairy *Bos taurus*-*Bos indicus* embryos for milk production in poor environments. **Journal of Animal Breeding Genetics**, v. 113, p. 471-481, 1996.

THIELE, J. J.; FREISLEBEN, H. J.; FUCHS, J.; OSCHENDORF, F. R. Ascorbic acid and urate in human seminal plasma: determination and interrelationship with chemiluminescence in washed semen. **Human Reproduction**, v. 10, p. 110-115, 1995.

TURNER, J. W. Genetic and biological aspects of Zebu adaptability. **Journal of Animal Science**, v. 50, n. 6, 1201-1205, 1980.

TWIGG, J.; FULTON, N.; GOMEZ, E.; IRVINE, A. S.; AITKEN, E. J. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. **Human Reproduction**, v. 13, n. 6, p. 1429-1436, 1998.

URSINI, F.; HEIM, S.; KIESS, M.; MAIORINO, M.; ROVERI, A.; WISSING, J.; FLOHÉ, L. Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. **Science**, v. 285, p. 1393-1396, 1999.

VERNET, P. ; FULTON, N.; WALLACE, C.; AITKEN, R.J. Analysis of plasma membrane redox system in rat epididymal spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 65; p. 1102-1113, 2001.

VETORATTO, L. F.; NICHI, M.; CORTADA, C. N. M.; FERREIRA, J. C. P. ; BARNABE, V. H. Comparação entre teste hipo-osmótico e motilidade retilínea progressiva na avaliação espermática de touros Nelore e Simental. In: Simpósio Internacional de Iniciação Científica, 10, Piracicaba-SP, 07 e 08 de novembro de 2001. **Anais...**, São Paulo, 2002, v. 1, p. 117.

VOGLER, C. J.; SAACKE, R. G.; BAME, J. H.; DEJARNETTE, J. M.; MCGILLIARD, M. L. Effects of scrotal insulation on viability characteristics of cryopreserved bovine semen. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3827-3835, 1991.

WAITES, G. M. H.; SETCHELL, B. P. Effects of local heating on blood flow and metabolism in the testis of the conscious ram. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 8, p. 339-349, 1964.

WAMBURA, P. N.; GWAKISA, P. S.; SILAYO, R. S.; RUGAIMUKAMU, E. A. Breed-associated resistance to tick infestation in *Bos indicus* and their crosses with *Bos taurus*. **Veterinary Parasitology**, v. 77, p. 63-70, 1998.

WANG, C.; CHAN, S. Y. W.; MATTHEW, N. G.; SO, W. K.; TSOI, W. L.; LO, T.; LEUNG, A. Diagnostic value of sperm function tests and routine semen analyses em fertile and infertile men. **Journal of Andrology**, v. 9. n. 6, p. 384-389, 1988.

WHITTINGTON, K.; HARRISON, S. C.; WILLIAMS, K. M.; DAY, J. L.; MCLAUGHLIN, E. A.; HULL, M. G. R.; FORD, W. C. L. Reactive oxygen species (ROS) production and outcome of diagnostic tests of sperm function. **International Journal of Adrology**, v. 22, p. 236-242, 1999.

WILDEUS, S.; HAMMOND, A. C. Testicular, semen and blood parameters in adapted and nonadapted *Bos taurus* bulls in the semi-arid tropics. **Theriogenology**, v. 40, p. 345-355, 1993.

WOLFF, H. The biological significance of white blood cells in sêmen. **Fertility and Sterility**, v. 63, p. 1143-1157, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO laboratory manual for the examination of human sperm and semen-cervical mucus interaction**, 4^a ed. Cambridge: University Press, 1999, 130p.

ZABLUDOVSKY, N.; ELTES, F.; GEVA, E.; BERKOVITZ, E.; AMIT, A.; BARAK, Y.; HAR-EVEN, D.; BARTOOV, B. Relationship between human sperm lipid peroxidation, comprehensive quality parameters and IVF outcome. **Andrologia**, v. 31, p. , 91-98, 1999.

ZINI, A.; BUCKSPAN, M.; JAMAL, M.; JARVI, K. Effect of varicocelectomy on the abnormal retention of residual cytoplasm by human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 14, n. 7, p. 1791-1793, 1999.

ZINI, A.; GARRELS, K.; PHANG, D. Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. **Urology**, v. 55, n. 6, p. 922-926, 2000.