

JOÃO RAFAEL CHINAIT GURGEL

**Efeito do plasma seminal sobre a susceptibilidade dos
espermatozoides equinos às diferentes espécies reativas de
oxigênio**

São Paulo

2014

JOÃO RAFAEL CHINAIT GURGEL

Efeito do plasma seminal sobre a susceptibilidade dos espermatozoides equinos às diferentes espécies reativas de oxigênio

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador

Prof. Dr. Ricardo José Garcia Pereira

São Paulo

2014

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3034 FMVZ	Gurgel, João Rafael Chinait Efeito do plasma seminal sobre a susceptibilidade dos espermatozoides equinos às diferentes espécies reativas de oxigênio / João Rafael Chinait Gurgel. -- 2014. 72 f. : il. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2014. Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal. Área de concentração: Reprodução Animal. Orientador: Prof. Dr. Ricardo José Garcia Pereira. 1. Sêmen. 2. Equino. 3. Antioxidantes. 4. Espécies reativas de oxigênio. I. Título.
----------------	--



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Susceptibilidade do sêmen equino às diferentes espécies reativas de oxigênio: efeito do plasma seminal", protocolado sob o nº 2912/2013, utilizando 13 (treze) equídeos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Renato Campanarut Barnabe, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 13/3/2013.

We certify that the Research "Suscebility of stallion sperm to distinct reactive oxygen species: the effect of seminal plasma", protocol number 2912/2013, utilizing 13 (thirteen) horses, under the responsibility Prof. Dr. Renato Campanarut Barnabe, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 3/13/2013.

São Paulo, 18 de março de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: GURGEL, João Rafael Chinait

Título: Efeito do plasma seminal sobre a susceptibilidade dos espermatozoides equinos às diferentes espécies reativas de oxigênio

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus e aos meus pais, pois sem eles realmente não teria sido possível a conclusão deste curso.

Ao meu amor, Ju, que nunca teria como agradecer pelo maior presente que poderia receber de alguém, Davi!

A querida D. Vera, pela hospitalidade ao me receber em São Paulo durante o curso. Mesmo com a distância e o pouco contato tenho grandes recordações. Diversas foram as conversas e os conselhos dados com muita sinceridade e humildade. Obrigado!

Ao Professor Renato Campanarut Barnabe e à Professora Valquiria Hyppolito Barnabe, meus mais sinceros e profundos agradecimentos.

A Guta e a Carol, não só pela amizade e confiança, mas por nunca deixarem de acreditar que este momento se tornaria realidade.

À equipe do laboratório de LA que permitiu que esse trabalho fosse possível, sempre com risos e amizades, tornando este caminho mais prazeroso. Obrigado Eduardo, Roberta, Diego, Mariana e Marcílio. Valeu mesmo Andressa pelas conversas e conselhos.

Ao Prof. Dr. Marcílio pelo ensinamento e orientação nessa jornada, sem saber dizer não, sempre que procurava ajuda.

A todos os professores do Departamento de Reprodução Animal, Profa. Dra. Camila Infantsi Vannucchi, Profa. Dra. Clair Motos de Oliveira, Profa. Dra. Claudia Barbosa Fernandes, Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira, Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini, Prof. Dr. José Antônio Visintin, Prof. Dr. Marcelo Alcindo de Barros Vaz Guimarães, Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli e Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda, o meu muito obrigado!

Em especial ao Prof. Dr. Mário Binelli e Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Avila Assumpção que no momento em que precisei de apoio no curso, me incentivaram com suas palavras.

Ao Prof. Dr. Ricardo José Garcia Pereira pela paciência e seriedade na orientação.

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique Cabral Viana, ex-professor e agora colega, por ter despertado em mim o gosto pela reprodução, e por ter me ajudado tanto quando eu tinha dúvida sobre que destino seguir.

Aos amigos de São Lourenço.

Aos amigos e funcionários do Departamento de Reprodução Animal.

A todos os funcionários da biblioteca, principalmente Elza Faquim e Neusa Kazue por sua presteza e carinho com que atendem a todos os pós-graduandos.

Enfim, agradeço por todos os professores que foram importantes na minha vida acadêmica e no desenvolvimento desse mestrado, e aos amigos pelo incentivo e apoio constante.

RESUMO

GURGEL, J. R. C. **Efeito do plasma seminal sobre a susceptibilidade dos espermatozoides equinos às diferentes espécies reativas de oxigênio.** [Effect of the seminal plasma on stallion sperm susceptibility to distinct reactive oxygen species]. 2014. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A capacidade de preservar a viabilidade do sêmen pelo emprego das biotecnologias, como refrigeração e criopreservação, oferece muitas vantagens a equideocultura. O estresse oxidativo é um dos principais entraves para estas biotécnicas e advêm do ataque de distintas espécies reativas de oxigênio (EROs). Assim, o objetivo do presente estudo foi verificar o impacto das diferentes EROs sobre os espermatozoides com e sem plasma seminal. Foram colhidos ejaculados de 13 garanhões Mangalarga Marchador de fertilidade conhecida. Os ejaculados foram divididos em duas frações (A e B). As frações foram centrifugadas (2200g/10min) e o *pellet* com os espermatozoides foi ressuscitado em solução salina fisiológica ou plasma seminal de modo que as duas frações apresentassem a mesma concentração final (sptz/mL). Ambas as frações (A e B) tiveram 4 alíquotas de 400µL retiradas e submetidas a 3 sistemas distintos de produção de EROs (xantina + xantina oxidase que produz anion superóxido; peróxido de hidrogênio; ferro + vitamina C que produz radical hidroxil) e malondialdeído. Após a incubação, as amostras A e B foram avaliadas de acordo com os testes funcionais (coloração de eosina-nigrosina para membranas, fast-green/rosa bengala para acrossomos, coloração 3-3'diaminobenzidina para atividade mitocondrial e SCSA™ para susceptibilidade a denaturação de cromatina) e avaliação do índice de peroxidação lipídica (TBARs). Todas as análises estatísticas foram realizadas pelo programa SAS System for Windows. A susceptibilidade do espermatozoide equino ao estresse oxidativo é variável de acordo com a espécie reativa de oxigênio empregada na incubação; as espécies mais deletérias no presente experimento foram a malondialdeído e principalmente o radical hidroxil o que já era esperado. Houve um efeito benéfico quanto a manutenção das funções celulares e status oxidativo em amostras cujo plasma seminal foi preservado. A proteção atribuída ao plasma

seminal influenciou parâmetros como atividade mitocondrial, susceptibilidade a denaturação ácida da cromatina e índice de peroxidação lipídica. O plasma seminal exerceu mais pronunciada proteção aos eventos desencadeados pela malondialdeído.

Palavras-chave: Sêmen. Equino. Antioxidantes. Espécies reativas de oxigênio.

ABSTRACT

GURGEL, J. R. C. **Effect of the seminal plasma on stallion sperm susceptibility to distinct reactive oxygen species.** [Efeito do plasma seminal sobre a susceptibilidade dos espermatozoides equinos às diferentes espécies reativas de oxigênio]. 2014. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Biotechnologies such as chilling and cryopreservation of equine semen have been largely used in horse breeding due to its importance on storage and propagation of genetic material. The oxidative stress is one of the main causes of poor results related to the fertility of processed stallion sperm. Oxidative injuries are mainly due to the attack of different reactive oxygen species (ROS). Thus, the aim of the present study was to evaluate the impact of distinct ROS attack on equine spermatozoa with and without seminal plasma. The collection of one ejaculate of thirteen Mangalarga fertile stallions were performed. Ejaculates were divided in two aliquots (A and B). These aliquots were centrifuged (600G /10 min) and pellets were resuspended in saline solution (0,9%) or seminal plasma certifying that each sample had the same concentration (sptz/mL). Both aliquots (A and B) were divided in four samples of 400 µL each and incubated with four ROS generating systems (superoxide anion; hydrogen peroxide; hydroxyl radical and malondialdehyde). After the 30 incubation, all the samples were evaluated for membrane integrity (eosin-nigrosin stain), acrosome integrity (simple stain of fast-green/ Bengal rose), 3-3'diaminbenzidine for mitochondrial activity and SCSA™ for the chromatin susceptibility to the acid denaturation. Lipid peroxidation was accessed by TBARs assay. Statistical analysis was performed using SAS System for Windows. The susceptibility of equine sperm to the oxidative stress is different in each ROS generation system; but the most deleterious ROS were hydroxyl radical and malondialdehyde. A positive effect of seminal plasma on the sperm viability was observed which may be linked to its protective role. The protection occurred in mitochondria, chromatin and against lipid peroxidation. Higher beneficial effect of seminal plasma was observed in samples treated with malondialdehyde.

Keywords: Semen. Equine. Antioxidant. Reactive oxygen species.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	SÊMEN DE GARANHÕES DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR: CRIOPRESERVAÇÃO E REFRIGERAÇÃO.....	19
2.1.1	Plasma Seminal	22
2.2	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS) E O ESPERMATOZOIDE.....	25
2.3	FORMAÇÃO DE EROS A PARTIR DO ESPERMATOZOIDE.....	29
2.4	DEFESAS ENZIMÁTICAS E NÃO ENZIMÁTICAS.....	30
3	HIPÓTESE	32
4	OBJETIVO	33
5	MATERIAL E MÉTODO	34
5.1	LOCAL.....	34
5.2	ANIMAIS EXPERIMENTAIS E MANEJO.....	34
5.3	PERÍODO EXPERIMENTAL.....	34
5.4	COLHEITA DE SÊMEN.....	34
5.5	PROCESSAMENTO DO SÊMEN.....	35
5.5.1	Sistema de produção das EROs e subproduto da peroxidação lipídica	35
5.6	ANÁLISE DO SÊMEN	36
5.6.1	Testes Convencionais	36
5.6.1.1	Avaliação da motilidade espermática.....	36
5.6.1.2	Avaliação do vigor espermático.....	37
5.6.1.3	Avaliação da morfologia espermática.....	37

5.6.2	Testes Funcionais	37
5.6.2.1	Integridade acrossomal.....	37
5.6.2.2	Integridade da membrana plasmática.....	38
5.6.2.3	Atividade mitocondrial.....	38
5.6.2.4	Ensaio da estrutura da cromatina espermática.....	39
6	RESULTADOS	41
7	DISCUSSÃO	52
8	CONCLUSÕES	61
	REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

Segundo dados da Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA), o país tem o terceiro maior rebanho de equinos do mundo, com plantel estabilizado em 5,9 milhões, além de 3 milhões de cabeças de muares e asininos. Esses animais são utilizados no trabalho rural, lazer, turismo, esportes e outras práticas como equoterapia. A equinocultura brasileira movimenta R\$ 7,5 bilhões por ano e gera 640 mil empregos diretos (LIMA et al., 2006). Visando um maior aproveitamento e intensificação do ritmo do melhoramento genético e a eficiência reprodutiva em equinos, houve a necessidade da utilização de biotecnologias reprodutivas com o objetivo de suprir a demanda existente em relação a cavalos com alto potencial genético nos sistemas de produção equina (MACHADO, 2002).

Embora um progresso considerável tenha ocorrido ao longo dos últimos anos em relação ao armazenamento do sêmen de equinos ainda existe uma diferença individual para o sucesso na preservação dessa amostra (BALL, 2008). A capacidade de preservar a viabilidade do sêmen pela refrigeração oferece muitas vantagens aos criadores de cavalos, como a possibilidade de coletar e processar o material num local e transportá-lo a diferentes localidades para inseminação de éguas. Com isso, é eliminado o custo e o estresse associado ao envio de éguas até o garanhão, além da redução da transmissão de doenças que poderiam afetar a égua recém chegada (GOMES; GOMES, 2009).

Se por um lado esse tipo de armazenamento celular possibilita ampliar a utilização seminal, por outro lado, a refrigeração reduz a viabilidade celular e a capacidade de fertilização, por isso, a melhoria na tecnologia de armazenamento do sêmen requer um conhecimento profundo da fisiologia do espermatozoide e dos processos bioquímicos que ocorrem durante a coleta e armazenamento seminal (KANKOFER et al., 2005). Algumas técnicas de reprodução assistida podem ser utilizadas com essa finalidade, como a criopreservação, que envolvem a remoção quase total do plasma seminal e, no entanto retira a proteção antioxidante dos espermatozoides aumentando sua susceptibilidade ao estresse oxidativo (BAUMBER et al., 2000).

O maior paradoxo da respiração aeróbia é que o oxigênio apesar de essencial para a produção de energia pode ser prejudicial desencadeando a produção das espécies reativas de oxigênio (EROs) (AGARWAL; SAID, 2005). Quando as EROS excedem o limite fisiológico causam danos estruturais significantes às membranas e, principalmente, ao material genético dos espermatozoides (NEILD et al., 2005). A identificação de quais EROs são mais prejudiciais ao sêmen equino é de fundamental importância uma vez que cada espécie reativa possui um mecanismo antioxidante ideal (NICHI, 2003). De fato, diversos estudos adicionam antioxidantes como o ácido ascórbico, catalase (AURICH et al., 1996), α -tocoferol e succinato de tocoferol (ALMEIDA; BALL, 2004) aos diluentes como forma de prevenção da peroxidação lipídica das membranas que ocorre durante o armazenamento que gera diminuição da fertilidade, no entanto, os resultados são controversos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Dentre as biotecnologias aplicadas ao sêmen de equino, a criopreservação envolve a retirada do plasma seminal o que pode ser um fator deletério ao *status* oxidativo da amostra. Neste contexto o sêmen de cavalo da raça Mangalarga Marchador se destaca por suportar menos a manipulação, perdendo muito capacidade fertilizante quando refrigerado e congelado.

2.1 SÊMEN DE GANHÕES DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR: CRIOPRESERVAÇÃO E REFRIGERAÇÃO

Diversas biotecnologias reprodutivas estão difundidas na criação equina, tais como a inseminação artificial com a manipulação de sêmen (refrigeração e congelação) e transferência de embriões. Atualmente, o Brasil é um dos países que mais realiza transferência de embriões equinos no mundo, tendo destaque a raça Mangalarga Marchador. Entretanto, existem alguns pontos que impedem a difusão plena dessas biotecnologias como, por exemplo, os resultados inconstantes e por vezes insatisfatórios ao se trabalhar com sêmen de ganhão dessa raça. Outro entrave para utilização de algumas biotécnicas é a regulamentação proibitiva das associações de raças de cavalo, circunstância que não se aplica a associação de criadores do cavalo Mangalarga Marchador uma vez que a mesma recentemente aceitou o uso do sêmen congelado de ganhões (GOMES; GOMES, 2009).

A capacidade de produção espermática da raça Mangalarga Marchador é outro fator limitante pois ela é, para a maioria dos ganhões, inferior a outras raças. O número médio de espermatozoides produzidos diariamente em raças como Quarto de Milha e cavalos de origem germânica varia de 5 a 10 bilhões, ao passo que na raça Mangalarga Marchador a média diária é de 3 a 5 bilhões. Além disso, de acordo com Alvarenga e Papa (2007) os espermatozoides dessa raça são aparentemente menos resistentes aos processos de refrigeração e congelação.

A refrigeração tem sido estudada com o objetivo de manter o potencial fertilizante do sêmen equino por vários dias, tornando mais fácil o seu transporte e utilização (MEDEIROS et al., 2002). Entretanto, há uma variação considerável nas taxas de fertilidade do sêmen equino refrigerado que está associada aos seguintes fatores: fertilidade intrínseca do garanhão e da égua, composição do diluente, curva de refrigeração e temperatura de armazenamento do sêmen diluído, tempo de armazenamento, dose inseminante (número de espermatozoides móveis), proximidade da ovulação e o tempo de armazenamento *in vitro* e quantidade de plasma seminal no momento da refrigeração (JASKO, 1994; PICKETT, 1995; ALVARENGA, 2002).

Segundo Loomis (1993), o sucesso da preservação espermática pela refrigeração depende de ambiente adequado (diluidores), taxa de refrigeração relativamente lenta, e temperatura de manutenção que reduza o metabolismo espermático a ponto de minimizar os danos à membrana plasmática e impedir a ocorrência prematura do fenômeno de capacitação. Porém, a exposição do sêmen desprotegido a baixas temperaturas resulta em desarranjos morfológicos e bioquímicos que tornam os espermatozoides irreversivelmente imóveis e inférteis (WATSON, 1981). A mudança brusca de temperatura resulta em danos do choque frio, caracterizado por padrões anormais de movimento espermático, perda rápida de motilidade, danos ao acrossoma e membrana plasmática, redução de metabolismo e perda de componentes intracelulares (WATSON, 1981; AMANN; GRAHAM, 1992). Similarmente, o resultado da criopreservação de sêmen está sob a influência de diversos fatores como taxa de congelação e descongelação, meio diluente, substâncias crioprotetoras e principalmente a resistência individual dos espermatozoides ao processo de congelação e descongelação (HOLT, 2000). Portanto, reprodutores que apresentam baixa motilidade espermática e integridade celular após descongelação geram índices de fertilidade insatisfatórios, não havendo até o momento técnicas e protocolos ideais disponíveis para criopreservar o material genético da maioria destes animais (GOMES et al., 2002).

Segundo Aman e Picket (1987) mostraram haver um fator individual em relação à congelabilidade entre garanhões. No Brasil, Alvarenga et al. (2002), também verificaram este padrão após a análise de aproximadamente 80 garanhões de raças diferentes. Tal estudo concluiu que 50% dos garanhões de raças de

hipismo (Hannoveriano, Holsteiner e Trackner) e Quarto de milha apresentavam sêmen com bons resultados de motilidade pós-descongelamento, ao passo que raças como Mangalarga e Mangalarga Marchador os percentuais caíram em 15%. Estes achados enfatizam a existência de um fator racial e muitas vezes individual relacionado a resistência espermática à criopreservação. Neste sentido, dentre as variações inter e intra-específicas ao congelamento, a sensibilidade dos espermatozoides à refrigeração parece ter uma importante participação nas injúrias celulares. A suscetibilidade dos espermatozoides a refrigeração está intimamente ligada a composição lipídica de suas respectivas membranas plasmáticas. Por exemplo, espécies cujos os espermatozoides contém baixas concentrações de esteroides e altas concentrações de ácidos graxos polinsaturados são consideradas mais predispostas aos danos do choque térmico (DARIN-BENNETT; POULOS; WHITE, 1973).

As membranas espermáticas apresentam-se num estado fluido, sendo esta característica um pré-requisito para o desempenho de suas funções. Os principais fatores que afetam esta fluidez são as composições relativas entre fosfolipídios, colesterol e a temperatura na qual a membrana é exposta. Com a queda da temperatura os lipídios passam por uma transição, do estado líquido para um estado líquido cristalino, no qual as cadeias de ácidos graxos tornam-se desordenadas. Durante a contínua redução de temperatura, o estado de líquido cristalino é transformado em estado de gel nos quais as cadeias de ácidos graxos organizam-se em um modelo paralelo, produzindo uma estrutura rígida, tornando estas áreas fracas, sujeita a rupturas, fusões e permeáveis a íons (HAMMERSTEDT; GRAHAM; NOLAN, 1990). A severidade das injúrias celulares é dependente da temperatura final e da taxa da queda da temperatura, afetando a estrutura e a função da membrana espermática (AMANN; PICKETT, 1987).

Os lipídios apresentam-se de uma forma dinâmica na membrana plasmática dos espermatozoides, e este fator é de extrema importância na funcionalidade da membrana nos diversos eventos que culminam na fertilização (ZAHN, 2006). Entre os constituintes da membrana plasmática dos espermatozoides, proteínas têm sido intensamente estudadas evidenciando a participação delas na manutenção das células durante a criopreservação. Zahn (2006) encontrou uma proteína a qual pode estar negativamente relacionada com congelabilidade do sêmen de garanhões e

várias proteínas do soro sanguíneo correlacionadas com a alta congelabilidade seminal dessa mesma espécie animal.

Adicionalmente, a criopreservação expõe os espermatozoides a variações extremas de temperatura e osmolaridade. Durante o congelamento ocorre a formação de cristais de gelo levando a um aumento das concentrações de soluto no meio extracelular, elevando a osmolaridade. Nesta etapa as células perdem água com a finalidade de manter o equilíbrio entre o meio intra e extracelular. Quando estas células são expostas novamente a meios isotônicos, como acontece na descongelação ou mesmo quando entram em contato com secreções do trato reprodutivo das fêmeas, ocorre uma entrada de água na célula devido às diferenças de osmolaridade do meio intra e extracelular (HOLT; HOLT; NORTH, 1994). Portanto, o estresse osmótico induzido pelos crioprotetores aos espermatozoides durante o processo de criopreservação é um dos principais fatores que comprometem a viabilidade espermática (MEDEIROS et al., 2002).

Em equinos, a remoção do plasma seminal é uma técnica utilizada rotineiramente na criopreservação de sêmen, sendo essencial e necessária para o sucesso da congelação (ALVARENGA, 2002). No entanto, muitos agentes antioxidantes enzimáticos (catalase, superóxido desmutase, glutathione peroxidase) e não enzimáticos (albumina, taurina, hipotaurina, piruvato, ácido ascórbico, tocoferol e ergotionina) são encontrados no plasma seminal a fim de proteger os espermatozoides do dano celular causado pelo estresse oxidativo (BAUMBER et al., 2000).

2.1.1 Plasma Seminal

Sêmen é a suspensão celular contendo espermatozoides (gametas masculinos) e secreções dos órgãos acessórios do trato genital masculino. A porção líquida desta solução é conhecida como plasma seminal (ALVARENGA, 2002). Alguns estudos colocam o plasma seminal como modulador da resposta inflamatória pós-coital em éguas (TROEDSSON et al., 1999), enquanto que evidências apontam que sua adição no momento da inseminação não reduz o número de leucócitos e a

fagocitose espermática (DELL'AQUA JR., 2004). Sabe-se, porém, que ele contém um grande número de proteínas que recobrem as proteínas de membrana do espermatozoide durante diferentes estágios da maturação celular. Diferentes funções destas proteínas e interações complexas entre estas e as subpopulações de proteínas de membrana podem explicar os resultados aparentemente diferentes dos efeitos imunológicos do plasma seminal (ZAHN, 2006).

As principais proteínas do fluido da rede testis, as clusterinas e as transferrinas, são repostas no fluido por clusterinas secretadas e por um membro da família das transferrinas, a lactoferrina. Suspeita-se que estas podem estar envolvidas na proteção dos espermatozoides contra oxidação e/ou ataques bacterianos durante seu transporte e armazenamento (GATTI et al., 2004). Por muitos anos acreditou-se que a lactoferrina tivesse ação antimicrobiana devido ao sequestro de ferro, privando os patógenos deste nutriente. Porém, atualmente, sabe-se que esta proteína possui uma atividade bactericida e não bacteriostática, resultado de sua interação direta sobre as bactérias (FARNAUD; EVANS, 2003). Em garanhões, a lactoferrina já foi isolada no plasma seminal, porém seu papel fisiológico neste fluido não está esclarecido (INAGAKI et al., 2002). Além disso, as clusterinas estão entre as proteínas que se associam à membrana espermática (apenas algumas isoformas) aparentemente auxiliando na integridade espermática (O'BRYAN et al., 1994).

Fuse et al. (1999) foram os primeiros a relatar a presença de zinco no sêmen, mesmo em amostras azoospérmicas, demonstrando que este elemento não é liberado pelo espermatozoide. O zinco é encontrado nos espermatozoides e nos líquidos seminais, onde tem concentração maior do que em todos os demais fluidos corpóreos. No líquido seminal, o zinco é produzido principalmente pela próstata e, nos espermatozoides, o zinco tem sido predominantemente localizado nas fibras densas do flagelo (HENKEL et al., 1999). Relatos mostram que o zinco pode ser o fator primário responsável pela atividade antibacteriana do plasma seminal e pode ter um papel na produção e viabilidade espermáticas, na prevenção da degradação e na estabilização da membrana (CHIA et al., 2000).

No plasma seminal, as altas concentrações de zinco exercem múltiplos papéis nas propriedades funcionais dos espermatozoides, tais como influenciar a fluidez dos lipídios e, com isso, a estabilidade das membranas; afetar a estabilidade da cromatina espermática e regular o processo de capacitação e reação do

acrossomo (EGGERT-KRUSE et al., 2002). Experimentos com sêmen humano testando a capacidade antioxidante do zinco sugerem que este íon participa das alterações oxidativas após a ejaculação, podendo modular as propriedades espermáticas (HENKEL et al., 1999). Sabe-se que o zinco mantém a viabilidade espermática através da inibição de DNAses e que é um potente removedor do excesso de ânions superóxido produzidos por espermatozoides lesados (CHIA et al., 2000).

Outro microelemento encontrado no plasma seminal e de suma importância para a viabilidade espermática é o selênio. O selênio é um componente essencial da glutathione peroxidase (OLDEREID; THOMASSEN; PURVIS, 1998) e o aumento dos seus níveis aumenta a atividade antioxidante dessa enzima diminuindo, assim, as espécies reativas de oxigênio e levando a um aumento da fertilidade masculina (KENDALL et al., 2000). O efeito mais característico da deficiência de selênio em espermatozoides de mamíferos é uma diminuição na motilidade, fratura da peça intermediária e aumento na incidência de anormalidades morfológicas, especialmente na cabeça (OLDEREID; THOMASSEN; PURVIS, 1998). Embora a relação entre as concentrações de selênio no fluido seminal e a qualidade espermática não seja bem estabelecida, alguns trabalhos mostram correlação positiva e significativa entre as concentrações de selênio no plasma seminal e a contagem espermática (OLDEREID; THOMASSEN; PURVIS, 1998).

Em ganhões, um estudo demonstrou que a adição de plasma seminal concentrado durante o processo de congelamento promoveu um efeito benéfico à criopreservação, enquanto que a adição de uma porção do plasma seminal rica em proteínas de baixo peso molecular proporcionou resultados piores do que os observados no grupo controle, mostrando que estas proteínas diminuem a motilidade e causam danos à integridade da membrana espermática (ZAHN, 2006). Adicionalmente, Aurich et al. (1996) observaram que a adição de 30% de plasma seminal de ganhões de alta motilidade espermática pós-descongelamento a ejaculados de ganhões de baixa motilidade pós-descongelamento aumentou a motilidade progressiva de $24 \pm 1,6$ para $34,5 \pm 1,9\%$ e a integridade de membrana de $27 \pm 2,1$ para $34,3 \pm 2,3\%$. No mesmo trabalho, a adição de plasma seminal dos ganhões de baixa motilidade pós-descongelamento ao ejaculado de ganhões de alta motilidade pós-descongelamento diminuiu a motilidade progressiva mas não alterou a integridade de membrana. Este trabalho demonstrou que a composição do

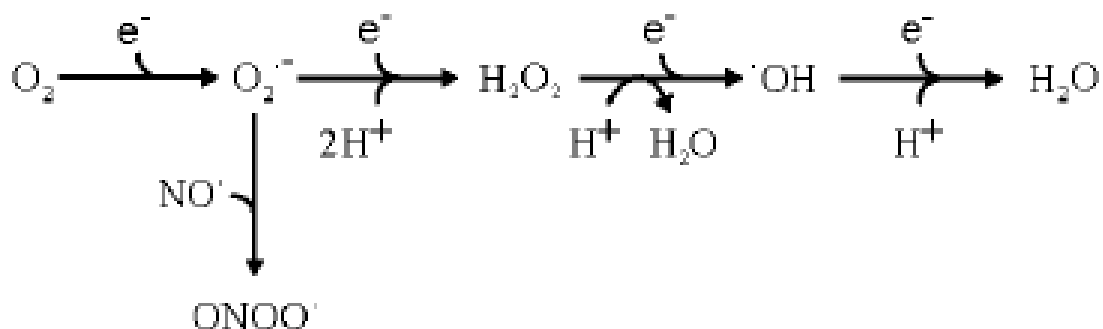
plasma seminal é um dos fatores que determinam a congelabilidade do sêmen de garanhões (AURICH et al., 1996).

Ainda, em algumas pesquisas foram encontrados fatores no plasma seminal prejudiciais à fertilidade ou congelabilidade do sêmen. Por exemplo, Moustafa e Meszaros (1980) sugerem que as proteínas presentes no plasma seminal se liguem às proteínas de membrana dos espermatozoides provocando algumas alterações bioquímicas, o que aumentaria a permeabilidade da membrana e, por conseguinte, injúrias celulares e choque térmico durante a congelação.

2.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS) E O ESPERMATOZOIDE

EROs são radicais livres definidos por átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desapareados. Entre as espécies reativas de oxigênio, destacam-se o radical hidroxil (OH^\cdot), o ânion superóxido ($\text{O}_2^\cdot^-$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o óxido nítrico (NO^\cdot). O ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio são EROs formadas primariamente, sendo o H_2O_2 gerado através da dismutase enzimática ou não enzimática do ânion superóxido. Porém, a ERO mais reativa e prejudicial é o radical hidroxil, que pode ser formada através do H_2O_2 e do ânion superóxido, e também através da reação do ânion superóxido com o óxido nítrico produzindo o peroxinitrito (ONOO^\cdot), que então irá se decompor para NO_2 e OH^\cdot (Figura 1; NICHI, 2003).

Figura 1 - Formação das EROs



Fonte: (NICHI, 2003).

O ânion superóxido, gerado a partir de uma 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 (RODRIGUES, 2009). A formação de superóxido acontece espontaneamente, especialmente no meio aeróbico, rico em elétrons, próximo à membrana mitocondrial interna, que ocorre devido ao escape de elétrons da cadeia respiratória (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não é um radical livre, mas é um metabólito do oxigênio extremamente deletério porque participa como intermediário na reação que produz o radical OH^\cdot . É gerado a partir da dismutação enzimática do O_2^\cdot pela superóxido dismutase, tem vida longa e é capaz de atravessar membranas biológicas (MAIA; BICUDO, 2009). Já o radical hidroxil é considerado o EROs mais reativo em sistemas biológicos, sendo capaz de causar mais danos do que qualquer outro radical livre. É formado a partir do peróxido de hidrogênio, em uma reação catalisada por íons metais (Fe^{++} ou Cu^{++}), denominada reação de Fenton. O OH^\cdot reage rapidamente com biomoléculas e pode desencadear a peroxidação dos lipídios na membrana plasmática do espermatozoide (ARUOMA et al., 1989; NICHII, 2003; RODRIGUES, 2009).

O óxido nítrico apresenta aspectos similares ao O_2^\cdot , visto que não reage diretamente com as biomoléculas apesar de seu elétron despareado. O NO^\cdot reage facilmente com outros radicais livres, gerando principalmente radicais menos reativos, funcionando então, como um antioxidante. Porém, se O_2^\cdot for produzido em grandes quantidades paralelamente com o NO^\cdot , ambos reagem produzindo o peroxidonitrito ($OONO^\cdot$), altamente citotóxico (HALLIWELL; GUTERIDGE, 1989).

O estresse oxidativo representa uma condição associada com um aumento da taxa de dano celular induzida por EROs (BAUMBER et al., 2000), sugerido como um fator importante na interrupção da função do espermatozoide há mais de 60 anos atrás (BALL; VO; BAUMBER, 2001). No entanto, recentemente é que a importância do estresse oxidativo no espermatozoide normal e anormal se tornou mais evidente. As EROs têm um papel importante na função espermática normal e um desequilíbrio

entre produção e degradação das mesmas pode ter sérios efeitos adversos sobre o espermatozoide, particularmente durante a refrigeração ou criopreservação de espermatozoides. Este dano nestes casos é ainda maior porque grande parte do plasma seminal, que contem os mecanismos de proteção antioxidante, é removido (BALL, 2008).

O estresse oxidativo é uma consequência do desequilíbrio entre produção de EROs e mecanismos antioxidantes, podendo ser causado por excesso da produção ou redução das defesas aos radicais. Este fenômeno provoca uma queda nos níveis de ATP intracelular, que irá causar diminuição da motilidade dos espermatozoides e também da peroxidação lipídica nos ácidos graxos poli-insaturados da membrana plasmática. Tais eventos têm sido associados com o aumento de permeabilidade celular e, à inativação de enzimas e produção de produtos finais espermicidas. A peroxidação lipídica tem sido apontada como causa de reação do acrossomal anormal e perda de fluidez da membrana, culminando em um potencial diminuído da capacidade de fertilização dos espermatozoides (BALL; VO; BAUMBER, 2001).

A produção de EROs pelos espermatozoides é um processo fisiológico normal, sendo importante para a regulação da taxa de hiperativação, ocorrência da reação acrossômica e fusão espermatozoide/oócito (AGARWAL; SAID, 2005; NEILD et al., 2005; NICHI et al., 2007). Em condições experimentais, Baumber et al. (2003), demonstraram que baixas concentrações de EROs podem ter um papel fisiológico importante no sêmen de equinos, que sob níveis controlados de O_2^- e H_2O_2 manteve capacitação, hiperativação, reação acrossômica e fusão espermatozoide/oócito, similarmente ao sêmen humano.

Em condições fisiológicas, uma geração menor de EROs é estimulada na presença de cálcio, e a da NADPH membrana-associada oxidase, NOX5, parece ser o provável mecanismo para esta geração de EROs. Esta menor geração de EROs por um espermatozoide equino é importante na indução de capacitação com um concomitante aumento na fosforilação tirosina. Esta observação é confirmada pela constatação de que durante a capacitação de espermatozoide equino *in vitro* há um aumento na produção do ânion superóxido. Baixas concentrações de EROs são capazes de induzir a capacitação espermática, o que gera impactos na preservação do espermatozoide. Durante a criopreservação, há um aumento intracelular no espermatozoide da concentração de cálcio, além de um aumento da geração de

EROs e uma capacidade antioxidante reduzida devido a remoção do plasma seminal. Estes fatores podem levar, por sua vez à capacitação prematura de espermatozoides, com uma conseqüente redução na longevidade de dos mesmos durante a criopreservados (BALL, 2008).

Outro fator que torna os espermatozoides potencialmente susceptíveis às EROs é sua estrutura celular. Por apresentar baixas concentrações de enzimas antioxidantes em seu reduzido citoplasma (NICHII, 2003) e membranas espermáticas ricas em ácidos graxos poliinsaturados, podem facilmente sofrer peroxidação lipídica na presença de EROs. Com isso, ocorrem alterações na fluidez da membrana que finalmente à culminam na diminuição da capacidade fertilizante. Os subprodutos e produtos finais da peroxidação lipídica, tais como as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) ou hidroxinonenal também exercem efeitos tóxicos e podem diminuir a motilidade do espermatozoide. Estes produtos podem servir como indicadores bioquímicos da peroxidação lipídica (KANKOFER et al., 2005).

Após atingir a maturidade, o espermatozoide perde a maioria de suas organelas, a transcrição do DNA é cessada, e os mecanismos de reparo se tornam indisponíveis, portanto a partir deste momento os danos na membrana resultam em perda irreversível das funções (PAGL; AURICH; KANKOFER, 2006).

Os espermatozoides são expostos a mudanças osmóticas durante o trânsito no epidídimo, no trato reprodutivo da fêmea, ou como conseqüência do efeito de alguns lubrificantes utilizados durante a coleta de sêmen, bem como durante a criopreservação e descongelamento dos espermatozoides. O estresse osmótico tem efeito negativo sobre a motilidade, viabilidade e potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides equinos que, tanto em meios hiperosmóticos quanto meios hiposmóticos, estimulam a formação do ânion superóxido (BURNAUGH et al., 2010).

Danos à mitocôndria espermática é um aspecto importante durante a criopreservação. Frequentemente, a avaliação morfológica dos espermatozoides após o congelamento e descongelamento demonstram de moderada a acentuada expansão da peça intermediária representando a distensão das mitocôndrias, o que sugere que as mitocôndrias do espermatozoide são um local importante de ocorrência de crioinjúria para essas células com a possibilidade de alteração do metabolismo citoquímico normal, geração de EROs e indução de apoptose (BALL, 2008).

Em humanos, dano ao DNA do espermatozoide é um dos principais contribuintes para a infertilidade, aborto espontâneo e defeitos congênitos na prole (AITKEN; DE IULIIS, 2010). O mecanismo responsável pela fragmentação do DNA no sêmen incluiu aqueles que ocorrem durante a espermatogênese testicular e do transporte através do trato reprodutivo masculino. Dentre os mecanismos estão i) a apoptose no epitélio dos túbulos seminíferos, ii) defeitos na remodelagem da cromatina durante o processo de espermiogênese, iii) EROs atuando diretamente na migração de espermatozoides dos túbulos seminíferos do epidídimo e, provavelmente, de forma indireta na ativação de caspases e endonucleases do espermatozoide (AITKEN; DE IULIIS, 2010; SAKKAS; ALVAREZ, 2010). Em equinos, tanto a criopreservação como as EROs promovem fragmentação de DNA, mas ainda não foram elucidados os mecanismos de ação destes agentes (BAUMBER et al., 2003).

2.3 FORMAÇÃO DE EROS A PARTIR DO ESPERMATOZOIDE

As principais fontes de EROs no sêmen são os leucócitos, principalmente neutrófilos e macrófagos, que promovem geração de espermatozoides anormais e danificados (AGARWAL et al., 2005; KANKOFER et al., 2005). Em humanos, existem fontes exógenas da produção das EROs como radiação (telefones móveis), toxinas (produtos industrializados), tabagismo e consumo de álcool (AGARWAL; GUPTA; SIKKA, 2006).

A capacidade de geração de EROs é significativamente maior em espermatozoides anormais, particularmente as células com presença de gotas protoplasmáticas que apresentam maior conteúdo celular das enzimas presentes no citoplasma, incluindo a glicose-6-fosfato desidrogenase. Esta enzima é responsável pelo fluxo de glicose através do *shunt* hexose monofosfato e a geração de NADPH. Teoriza-se que o NADPH gerado através deste sistema serve como a principal fonte de elétrons responsável pela produção da O_2^- por espermatozoides humanos. Portanto, a porção de citoplasma residual cria uma situação em que o substrato

suficiente estaria disponível para apoiar uma excessiva geração de NADPH-dependente de EROs (BAUMBER et al., 2000).

Os dois principais locais de produção de EROs são a mitocôndria e a membrana plasmática de espermatozoides. A mitocôndria é a força motriz da respiração. Por isso, é o principal sítio de geração de EROs, que são produzidos através da nicotinamida adenina dinucleotídeo-dependente oxido-redutase. Em contrapartida, a membrana plasmática do espermatozoide produz EROs através da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato sistema oxidase dependente. A xantina oxidase, uma enzima-chave em catabolismo de purinas também está envolvida na produção de EROs em espermatozoides (AGARWAL et al., 2005).

Produção de EROs a partir espermatozoide equino parece ser derivada de uma NADPH oxidase (NOX5) específica presente na membrana plasmática da cabeça ou das mitocôndrias do espermatozoide. Embora o ânion superóxido (O_2^-) pareça ser a principal ERO gerada pelo espermatozoide equino, esta espécie de meia vida curta que, rapidamente será dismutado e formará o H_2O_2 , que provocará o maior efeito citotóxico no espermatozoide (BALL, 2008).

2.4 DEFESAS ENZIMÁTICAS E NÃO ENZIMÁTICAS

Espermatozoides e plasma seminal possuem uma série de enzimas e antioxidantes de baixo peso molecular que eliminam as EROs, a fim de prevenir danos celulares. Existem três sistemas de enzimas importantes, o sistema glutathiona peroxidase (GSx), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), que são descritas no plasma seminal. Outros componentes como o tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), urato, albumina, taurina e hipotaurina foram caracterizados como antioxidantes não enzimáticos no plasma seminal (BAUMBER et al., 2000).

A glutathiona peroxidase citosólica (GSH-Px) foi detectada em testes, mas a GSH-Px hidroperóxido fosfolípídico é a principal glutathiona peroxidase neste tecido. A GSH-Px hidroperóxido fosfolípídica protege as biomembranas do estresse oxidativo e está envolvida na regulação do REDOX (potencial de oxidação). A metaloproteína superóxido dismutase (SOD) é responsável pela produção de H_2O_2 e

O₂ durante a dismutação dos radicais superóxidos. O H₂O₂ que pode facilmente cruzar as membranas celulares e exercer efeitos citotóxicos é convertido em H₂O pela catalase (KANKOFER et al., 2005).

A atividade da CAT foi detectada em homogeneizados de plasma seminal, de testículos, de glândulas bulbouretrais, próstata e glândulas vesiculares de equinos. A atividade mais alta foi encontrada em homogeneizados das glândulas prostáticas e a mais baixa nos testículos e fluidos da cauda do epidídimo, indicando que a maior parte da atividade da CAT no sêmen representa enzimas provenientes da glândula prostática absorvidas para o espermatozoide. A exposição experimental do espermatozoide equino as EROs leva à uma diminuição na motilidade espermática e um aumento na fragmentação do DNA que poderia ser evitada pela adição de CAT e não de SOD. Nem a integridade da membrana, tão pouco a peroxidação lipídica foram alteradas em resposta a exposição as EROs (BALL et al., 2000). Em outro estudo, a adição de ácido ascórbico aumentou a percentagem de membranas intactas de espermatozoides no sêmen diluído durante o armazenamento a 5°C (KANKOFER et al., 2005).

A adição de um diluente a base de leite desnatado ao sêmen aumentou a atividade de todas as três enzimas avaliadas, GSH-Px, SOD e CAT, assim como a quantidade de TBARS, comparado ao sêmen não diluído. Um efeito comparável ocorreu quando o plasma seminal foi diluído mas não quando o espermatozoide separado do plasma seminal pela centrifugação foi ressuspensionado no diluente do sêmen ou na solução salina. A adição do diluente do sêmen desta forma aumenta claramente a capacidade antioxidativa/oxidativa do plasma seminal de garanhão. Este aumento indica interações positivas entre os componentes do diluente, componentes e enzimas antioxidativas no plasma seminal. O aumento da atividade antioxidante não é apenas um efeito de diluição, porque o diluente sozinho não apresentou tal atividade. No entanto, o diluente pode conter co-fatores ou outras substâncias, influenciando a atividade de enzimas antioxidantes. Os resultados sugerem que o diluente do sêmen requer a presença de pelo menos certa quantidade de plasma seminal para aumentar a capacidade antioxidativa enzimática. (KANKOFER et al., 2005).

3 HIPÓTESE

- I) A susceptibilidade do espermatozoide equino ao estresse oxidativo é variável em resposta à diferentes EROs.
- II) O plasma seminal influencia a resposta às incubações com diferentes EROs.

4 OBJETIVO

O objetivo do presente experimento foi verificar o impacto das diferentes EROs sobre os espermatozoides, avaliando a integridade acrossomal (POPE) e membrana plasmática (eosina/nigrosina), atividade mitocondrial (DAB) e integridade do DNA (SCSA™), com ou sem plasma seminal.

5 MATERIAL E MÉTODO

A descrição detalhada dos procedimentos será exposta a seguir.

5.1 LOCAL

As colheitas de sêmen foram realizadas na propriedade Haras Transwall localizada na região do sul de Minas Gerais, na cidade de Cristina. A primeira fase do experimento foi desenvolvida na propriedade acima descrita e a segunda fase foi desenvolvida no Laboratório de Andrologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), no Departamento de Reprodução Animal (VRA) em São Paulo, SP.

5.2 ANIMAIS EXPERIMENTAIS E MANEJO

Foram utilizados 13 garanhões da raça Mangalarga Marchador, com idades variando entre 3 e 12 anos, de fertilidade previamente conhecida e comprovada, alojados no respectivo haras sob manejo semi-intensivo, com água e sal *ad libitum* e suplementação concentrada diária.

5.3 PERÍODO EXPERIMENTAL

As colheitas de sêmen foram realizadas em junho de 2011 fora da estação reprodutiva dos equinos.

5.4 COLHEITA DE SÊMEN

O pênis foi previamente higienizado com solução salina aquecida (37°C) e com auxílio de uma compressa umedecida de algodão e as colheitas foram

realizadas por vagina artificial modelo Biotech® (Botucatu), com auxílio de uma égua em estro, devidamente contida fisicamente. Todos os ejaculados foram filtrados para remoção de gel e sujidades no momento da colheita.

5.5 PROCESSAMENTO DO SÊMEN

Previamente ao processamento, cada ejaculado foi avaliado quanto à concentração, motilidade, vigor e morfologia. Cada ejaculado foi dividido em duas frações de 3 mL cada (A e B) que em seguida foram centrifugadas a 2200 rpm/10min. O sobrenadante da fração A foi desprezado e o *pellet* foi ressuscitado em 3 mL de solução salina fisiológica aquecida a 37°C, e o *pellet* da fração B foi ressuscitado no próprio sobrenadante, de modo que as frações A e B apresentem a mesma concentração (sptz/mL). Em sequência, as frações A e B foram avaliadas quanto a funcionalidade espermática utilizando os testes para integridade de membrana plasmática (eosina/nigrosina), integridade acrossomal (fest green/rosa bengala – Pope), atividade mitocondrial (DAB) e estrutura do DNA (SCSA™).

Ambas as frações (A e B) tiveram 4 alíquotas retiradas e submetidas a 3 sistemas distintos de produção de EROs e um subproduto da peroxidação lipídica (malondialdeído) incubadas por 30 minutos em banho-maria a 37°C.

Após a incubação as amostras foram submetidas a análises de patologia espermática, concentração, vigor, motilidade e os testes funcionais realizados anteriormente.

5.5.1 Sistema de produção das EROs e subproduto da peroxidação lipídica

- 1) Para produção do ânion superóxido foram utilizados 15µL de xantina (0,0019g em 25mL NaOH 0,0001M) + 5µL de xantina oxidase (2µL em 200µL de EDTA 0,1mM) + 180µL de PBS em 400µL das amostras;
- 2) Para o peróxido de hidrogênio foram utilizados 200 µL de solução de peróxido de hidrogênio (41,21µL em 100mL qsp PBS) em 400 µL de amostra;
- 3) Para verificar a susceptibilidade ao malondialdeído, que é produto da peroxidação lipídica, foram utilizados 100µL de solução (99,8346µL MDA +

10mL água miliq + 100 μ L H₂SO₄ em 100mL qsp PBS) + 100 μ L PBS em 400 μ L das amostras;

- 4) Para produção do radical hidroxil foram utilizados 100 μ L da solução de vitamina C (20mM em 50 mL de solução fisiológica 0,9%) + 100 μ L da solução de ferro (4mM em 50 mL de solução fisiológica 0,9%) em 400 μ L das amostras.

5.6 ANÁLISE DE SÊMEN

A análise do sêmen foi realizada através de testes convencionais e funcionais.

5.6.1 Testes Convencionais

Os testes convencionais, utilizados neste experimento, foram: motilidade, vigor, morfologia espermática e concentração.

5.6.1.1 Avaliação da motilidade espermática

A motilidade foi então classificada, numa escala entre 0 e 100%, segundo a proporção de espermatozoides móveis nos campos observados sob aumento de 100x em microscópio convencional, sendo 0% para nenhum espermatozoide móvel no campo e 100% para todos os espermatozoides móveis.

5.6.1.2 Avaliação do vigor espermático

O vigor foi avaliado quanto ao movimento progressivo retilíneo dos espermatozoides numa escala de 0 a 5, na qual, 0 representa ausência de movimento e 5 representa movimentos progressivos intensos.

5.6.1.3 Avaliação da morfologia espermática

A avaliação morfológica dos espermatozoides foi realizada pelo método de câmara úmida; uma alíquota de 5 μ L de cada amostra seminal foi diluída em 95 μ L de solução de formaldeído-salina (diluição de 20); 15 μ L de cada amostra fixada serão colocados sobre lâmina e cobertos com lamínula; a avaliação se dará sob microscopia óptica em aumento de 1000x; 200 células foram computadas e a porcentagem de cada defeito foi aferida.

5.6.2 Testes Funcionais

Os testes funcionais utilizados no experimento foram a avaliação da integridade acrossomal, da integridade da membrana plasmática, da atividade mitocondrial e da estrutura do DNA espermático.

5.6.2.1 Integridade acrossomal

A avaliação da integridade acrossomal foi realizada com a Coloração Simples Fast-Green/Rosa-Bengala (POPE; ZHANG; DRESSER, 1991). Uma alíquota de cada amostra (5 μ L) foi adicionada ao Corante Simples de Pope (5 μ L), sendo a

mistura incubada por 60 segundos em mesa aquecida à 37°C. Após a incubação, foram feitos esfregaços sobre lâminas de microscopia.

Os esfregaços foram analisados em microscópio convencional sob aumento de 1250 vezes. Foram contadas 200 células por lâmina, classificadas como:

Acrossomo Íntegro: região acrossomal de coloração lilás à roxa, levemente mais escura que a região pós-acrossomal;

Acrossomo Não-íntegro: região acrossomal de coloração rosa, levemente mais clara que a região pós-acrossomal.

5.6.2.2 Integridade da membrana plasmática

A avaliação de integridade da membrana plasmática foi feita com a coloração de Eosina-Nigrosina (E/N), descrita por Barth e Oko (1989). Nesta coloração, por alterações na permeabilidade das membranas dos espermatozoides, a eosina consegue penetrar nas células corando-as de rosa. Os espermatozoides com membranas íntegras não permitem a entrada do corante, portanto, contrastando com o plano de fundo tomado pela coloração escura da nigrosina, as células aparecem brancas. Desta maneira, uma alíquota de sêmen (5 µL) foi misturada ao corante, na proporção de 1:1, e realizados esfregaços sobre lâminas de microscopia. As lâminas foram analisadas em microscópio convencional sob aumento de 1250 vezes. Foram contadas 200 células por lâmina, classificadas como células com membrana íntegra (não coradas) e não-íntegra (coradas).

5.6.2.3 Atividade mitocondrial

Segundo Hrudka (1987), a enzima Citocromo C-Oxidase (CCO) tem um papel fundamental no processo de respiração celular e metabolismo energético das células, além disso, é pré-requisito para as funções osmótica e sintética, motilidade e manutenção da estrutura celular. A técnica citoquímica desenvolvida por este autor

é baseada na oxidação da 3,3'-diaminobenzidina (DAB) pelo Complexo Citocromo C, o que inclui a CCO, através de uma reação em cadeia na qual o reagente é polimerizado e se deposita nos locais onde ocorre a reação, ou seja, se restringe à mitocôndria. Esta deposição pode ser identificada através de microscopia convencional pela sua coloração marrom. Desta maneira, é possível descrever o declínio espontâneo da CCO ocasionado por tratamentos físicos e/ou químicos aos que os espermatozoides são submetidos.

Para realização desta técnica, uma alíquota de 25µL de amostra foi incubada com 25µL de DAB (1mg/mL de PBS), a 37°C, por uma hora. Após incubação, foram feitos esfregaços em lâmina de vidro e estas fixadas em formol a 10% por 10 minutos. As lâminas foram então lavadas e secas no ar sob proteção da luz.

A atividade citoquímica da mitocôndria espermática foi avaliada segundo descrito por Hrudka (1987). Desta maneira, as lâminas foram observadas em microscópio de contraste de fase, sob aumento de 1000 vezes, em imersão. Foram contados 200 espermatozoides/lâmina, e classificados de acordo com o grau de coloração da peça intermediária em 4 classes:

- Classe I: células espermáticas com peça intermediária totalmente corada indicando alta atividade mitocondrial (DAB I).
- Classe II: células espermáticas com mais da metade dos segmentos corados (ativos) indicando atividade mitocondrial média a alta (DAB II).
- Classe III: células espermáticas com menos da metade dos segmentos corados (ativos) indicando alto comprometimento da atividade mitocondrial (DAB III).
- Classe IV: células espermáticas com peça intermediária totalmente descorada indicando ausência de atividade mitocondrial (DAB IV).

5.6.2.4 Ensaio da estrutura da cromatina espermática (SCSA™)

O Ensaio SCSA faz a determinação quantitativa da integridade da cromatina espermática, definida pela susceptibilidade do DNA à desnaturação ácido-induzida “*in situ*” (LARSON et al., 2000). Para está técnica, uma solução de baixo pH desnatura o DNA nos espermatozoides com a cromatina alterada (o que não

acontece com a cromatina intacta), e com o uso de um corante fluorescente intercalante pode-se fazer a determinação através da citometria de fluxo (EVENSON et al., 1999).

Para o Teste de SCSA, foi utilizada metodologia proposta por Evenson et al. (1999). Para isso, o sêmen de cada tratamento foi avaliado por citometria de fluxo. Resumidamente, o sêmen em banho-maria (37°C/30 segundos) foi diluído em tampão TNE na concentração de 2×10^6 células/mL. Um volume de 0,1 mL da diluição foi incubado com 0,2 mL de solução detergente (1% de Triton X-100) por 30 segundos para permitir o acesso da laranja de acridina ao DNA espermático. Após este período o sêmen foi incubado com 0,6 mL de solução de laranja de acridina (6µg/mL). As amostras foram analisadas utilizando o citômetro de fluxo Guava EasyCyte®, com excitação de 488 nm e 15 mW.

A avaliação da LA foi feita baseada na diferença entre a fluorescência emitida pelos espermatozoides com DNA íntegro (dupla fita), que emitem fluorescência verde e os com DNA fragmentado (fita simples), que emitem fluorescência vermelha.

6 RESULTADOS

A apresentação dos resultados obedece às probabilidades testadas e relatadas na tabela 1, de acordo com a presença ou ausência de interação significativa para cada variável avaliada.

Tabela 1 – Probabilidades do efeito da incubações com diferentes espécies reativas de oxigênio e do subproduto da peroxidação lipídica (Ânion: ânion superóxido; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; MDA: malondialdeído; Hidroxila: radical hidroxil), da presença do plasma seminal e da interação incubação*plasma seminal nas taxas de espermatozoides com membrana e acrossomo íntegros, espermatozoides com atividade mitocondrial DAB I, DAB II, DAB III e DAB IV, alterações morfológicas, e susceptibilidade ao estresse oxidativo em sêmen de equinos submetido à incubação com diferentes espécies reativas de oxigênio - São Lourenço, MG - 2011

	Incubações	Plasma	Incubação*Plasma
Motilidade (%)	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Vigor (0-5)	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Membrana plasmática (%)	<0,0001	0,0001	<0,0001
Integridade Acrossomal (%)	0,5628	0,9294	0,5332
DAB I (%)	<0,0001	0,0230	0,0001
DAB II (%)	<0,0001	0,0266	<0,0001
DAB III (%)	0,0003	<0,0001	0,0002
DAB IV (%)	<0,0001	<0,0001	<0,0001
SCSA (%)	<0,0001	0,0004	0,0002
Estreita na base	0,3977	0,5100	0,8933
Contorno anormal	0,2106	0,0240	0,5802
Solta anormal	0,7310	0,3061	0,1191
Subdesenvolvida	0,7303	0,5704	0,0380
Formas duplas	0,6858	0,7610	0,9637
Acrossomo	0,5745	1,0000	0,2681
Cauda dobrada com gota	0,1274	0,4739	0,9609
Cauda fortemente enrolada	0,9341	0,8742	0,6301
Cauda fortemente dobrada	0,8658	0,9927	0,8791
Gota proximal	0,0190	0,3905	0,6366
Gigante	0,3920	0,1508	0,5549
Inserção abaxial	0,8213	0,9808	0,9686
Solta normal	0,5057	0,8422	0,7829
Inserção oblíqua	0,8835	0,0065	0,9735
Inserção retroaxial	0,4210	1,0000	0,8889
Cauda enrolada	0,5220	0,7518	0,7911
Cauda dobrada	0,9085	0,8084	0,7326
Gota distal	0,2564	0,5248	0,9454
Normais	0,0525	0,1925	0,7513
MDA (ng/ml)	0,0032	0,0003	0,3487
MDA Sptz (ng/10⁶ sptz)	0,1492	0,0528	0,7238

Para as variáveis em que foi observada interação significativa ($p < 0,05$; Tabela 1), foi avaliado o efeito das incubações com as diferentes agentes pró-oxidativos com e sem plasma seminal e o efeito do plasma seminal em cada uma das

incubações. Por outro lado, as variáveis que não apresentaram interação significativa ($p>0,05$; Tabela 1) foram analisadas de acordo com os efeitos de cada um dos fatores separadamente (com plasma vs. sem plasma seminal; ânion superóxido vs. H_2O_2 vs. MDA vs. radical hidroxil).

Tabela 2 - Efeito das incubações com sistemas geradores de diferentes espécies reativas de oxigênio e do subproduto da peroxidação lipídica (Ânion: ânion superóxido; H_2O_2 : peróxido de hidrogênio; MDA: malondialdeído; Hidroxila: radical hidroxil) nas taxas de células móveis, vigor, integridade da membrana plasmática, espermatozoides com atividade mitocondrial DAB I, DAB II, DAB III e DAB IV, e fragmentação de DNA em sêmen equino processado com a presença de plasma seminal - São Lourenço, MG - 2011

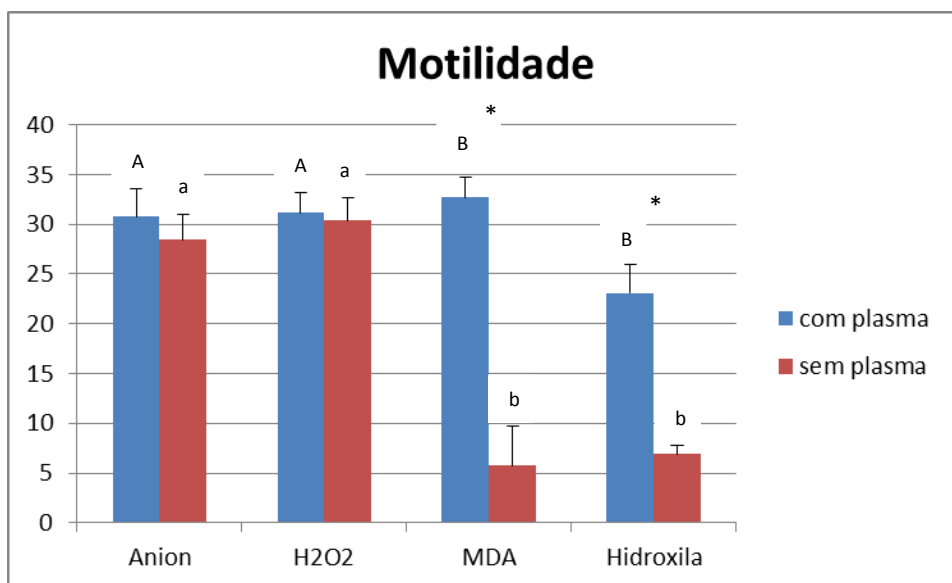
	Ânion	H_2O_2	MDA	Radical Hidroxil
Motilidade (%)	30.76 ± 2.76 ^a	31.15 ± 2.05 ^a	32.69 ± 2.01 ^a	23.07 ± 2.86 ^b
Vigor (0-5)	2.53 ± 0.14	2.61 ± 0.14	2.76 ± 0.12	2.53 ± 0.14
Membrana Plasmática (%)	53.23 ± 2.89	52.61 ± 4.68	51.07 ± 4.75	51.07 ± 3.37
DAB I (%)	43.07 ± 5.64 ^a	44.23 ± 5.60 ^a	44.15 ± 5.12 ^a	13.00 ± 3.40 ^b
DAB II (%)	30.38 ± 2.85 ^a	33.00 ± 4.10 ^a	31.76 ± 3.44 ^a	20.00 ± 1.67 ^b
DAB III (%)	11.76 ± 1.58 ^a	9.23 ± 1.29 ^{ab}	11.84 ± 70 ^a	5.61 ± 1.17 ^b
DAB IV (%)	14.76 ± 2.66 ^b	13.53 ± 2.24 ^b	12.23 ± 1.95 ^b	61.38 ± 3.88 ^a
SCSA (%)	3.34 ± 1.16	3.44 ± 1.38	3.99 ± 1.22	13.09 ± 6.12
Subdesenvolvida	0.15 ± 0.10	0	0.15 ± 0.10	0.07 ± 0.07

a,b,c: letras diferentes indicam diferença estatística ($p<0,05$)

Na avaliação das características funcionais dos espermatozoides submetidos à indução do estresse oxidativo com plasma seminal, verificou-se que o radical hidroxil foi o mais deletério. Uma menor porcentagem de espermatozoides móveis foi observada nas amostras incubadas com radical hidroxila em comparação às amostras incubadas com ânion superóxido, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e malondialdeído (23.07 ± 2.86, 30.76 ± 2.76, 31.15 ± 2.05, 32.69 ± 2.01, respectivamente; Tabela 2 e Gráfico 1). Da mesma forma, maiores taxas de espermatozoides com nenhuma atividade mitocondrial foram observadas no grupo tratado com radical hidroxil em comparação ao tratado com malondialdeído (61.38 ± 3.88, 12.23 ± 1.95, respectivamente; Tabela 2 e Gráfico 4). É importante destacar

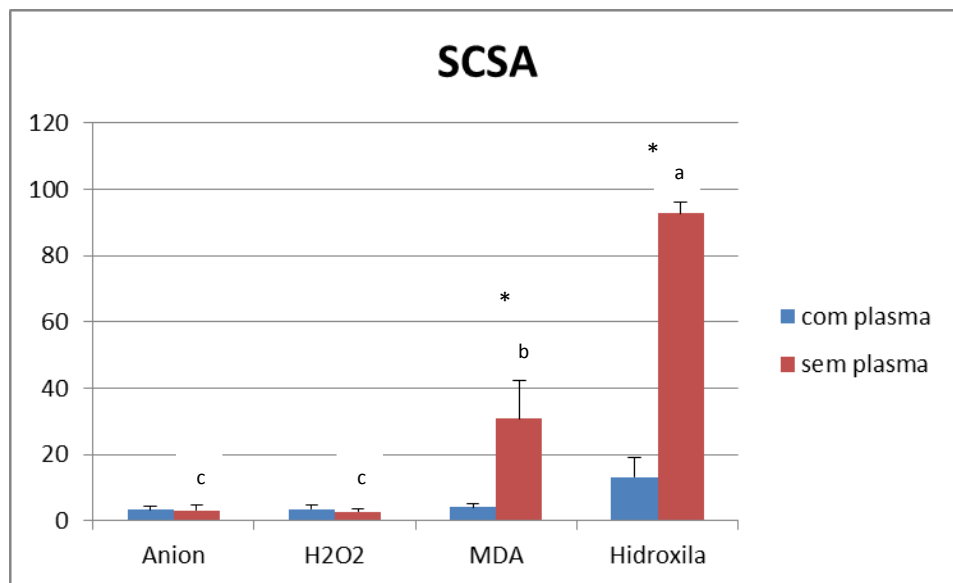
que, apesar de não ser possível detectar diferença estatística, houve um aumento de 4 vezes na fragmentação de DNA das incubações com radical hidroxil em relação as tratadas com malondialdeído (MDA), ânion superóxido e H₂O₂ (13.09 ± 6.12 , 3.99 ± 1.22 , 3.34 ± 1.16 , 3.44 ± 1.38 , respectivamente, Tabela 2 e Gráfico 2).

Gráfico 1 – Efeito das incubações, com e sem plasma seminal, de diferentes espécies reativas de oxigênio e do subproduto da peroxidação lipídica sobre a motilidade espermática



* diferença entre induções com e sem plasma seminal
 AB diferença entre induções com plasma seminal
 ab diferença entre induções sem plasma seminal

Gráfico 2 - Efeito das incubações, com e sem plasma seminal, de diferentes espécies reativas de oxigênio e do subproduto da peroxidação lipídica sobre a susceptibilidade a denaturação ácido do DNA



* diferença entre induções com e sem plasma seminal
abc diferença entre induções sem plasma seminal

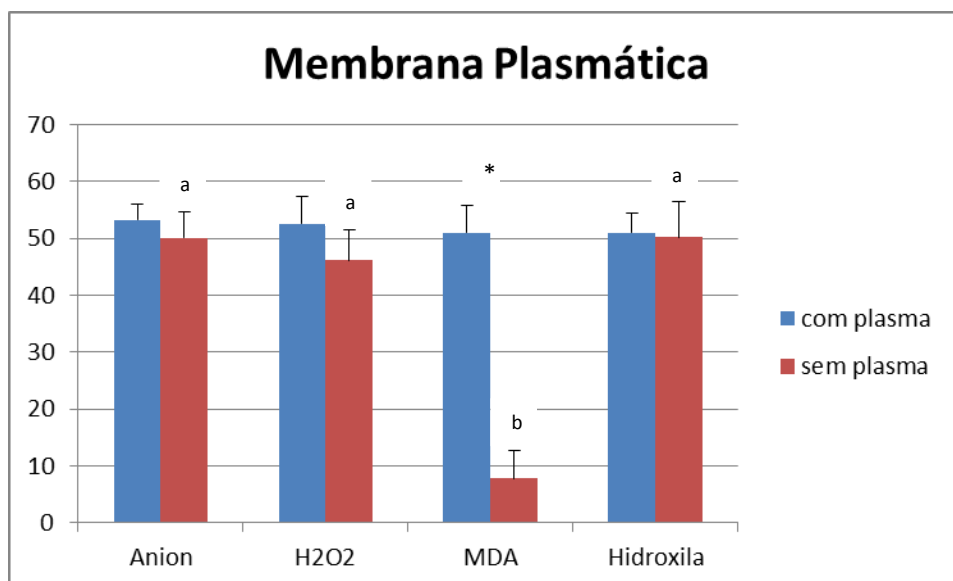
Tabela 3 - Efeito das incubações com sistemas geradores de diferentes espécies reativas de oxigênio e do subproduto da peroxidação lipídica (Ânion: ânion superóxido; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; MDA: malondialdeído; Hidroxila: radical hidroxil) nas taxas de células móveis, vigor, integridade da membrana plasmática, espermatozoides com atividade mitocondrial DAB I, DAB II, DAB III e DAB IV, e fragmentação de DNA em sêmen equino processado sem o plasma seminal - São Lourenço, MG - 2011

	Ânion	H ₂ O ₂	MDA	Radical Hidroxil
Motilidade (%)	28.46 ± 2.55 ^a	30.38 ± 2.29 ^a	5.76 ± 3.91 ^b	6.92 ± 0.90 ^b
Vigor (0-5)	2.61 ± 0.14 ^a	2.84 ± 0.10 ^a	0.46 ± 0.31 ^c	1.38 ± 0.14 ^b
Membrana Plasmática (%)	50.07 ± 4.53 ^a	46.15 ± 5.43 ^a	7.84 ± 4.90 ^b	50.23 ± 6.31 ^a
DAB I (%)	39.46 ± 3.82 ^a	42.76 ± 3.96 ^a	9.23 ± 5.57 ^b	21.76 ± 4.49 ^b
DAB II (%)	37.61 ± 2.84 ^a	33.69 ± 2.95 ^a	5.15 ± 3.50 ^c	18.84 ± 2.97 ^b
DAB III (%)	8.84 ± 1.24 ^a	8.76 ± 0.80 ^a	1.00 ± 0.67 ^c	4.61 ± 1.37 ^b
DAB IV (%)	14.07 ± 2.51 ^c	14.76 ± 2.04 ^c	84.61 ± 9.31 ^a	54.76 ± 4.28 ^b
SCSA (%)	3.09 ± 1.49 ^c	2.67 ± 0.92 ^c	30.76 ± 11.42 ^b	92.70 ± 3.25 ^a
Subdesenvolvida	0 ^b	0.30 ± 0.17 ^a	0 ^b	0.23 ± 0.12 ^a

a,b,c: letras diferentes indicam diferença estatística (p<0,05)

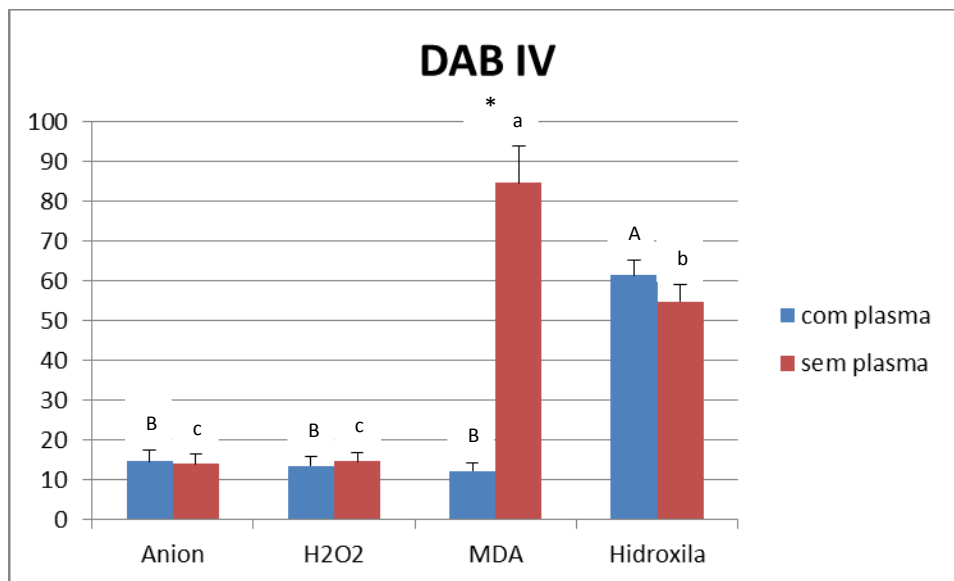
Na avaliação das características funcionais dos espermatozoides submetidos à indução do estresse oxidativo sem plasma seminal, verificou-se que o radical hidroxil e o MDA foram os mais deletérios. Uma menor porcentagem de espermatozoides móveis foi observada nas amostras incubadas com radical hidroxil e MDA em comparação às amostras incubadas com ânion superóxido e H_2O_2 (6.92 ± 0.90 , 5.76 ± 3.91 , 28.46 ± 2.55 , 30.38 ± 2.29 , respectivamente; Tabela 3; Gráfico 1). Da mesma forma, maiores taxas de espermatozoides com nenhuma atividade mitocondrial foram observadas no grupo tratado com MDA e hidroxil em comparação ao tratado com ânion superóxido e H_2O_2 (84.61 ± 9.31 , 54.76 ± 4.28 , 14.07 ± 2.51 , 14.76 ± 2.04 , respectivamente; Tabela 3 e Gráfico 4). Além disto, houve um maior dano em membrana plasmática na incubação com MDA em relação aos demais tratamentos (**MDA:** 7.84 ± 4.90 ; **H_2O_2 :** 46.15 ± 5.43 ; **Ânion:** 50.07 ± 4.53 ; **Hidroxil:** 50.23 ± 6.31 ; Tabela 3 e Gráfico 3). É importante salientar que uma maior fragmentação de DNA foi encontrada na incubação com MDA quando comparado com o ânion superóxido e H_2O_2 , no entanto o radical hidroxil foi o que gerou o maior dano dos tratamentos (30.76 ± 11.42 , 3.09 ± 1.49 , 2.67 ± 0.92 , 92.70 ± 3.25 , respectivamente; Tabela 3 e Gráfico 2).

Gráfico 3 - Efeito das incubações, com e sem plasma seminal, de diferentes espécies reativas de oxigênio e do subproduto da peroxidação lipídica sobre a integridade da membrana plasmática



* diferença entre induções com e sem plasma seminal
ab diferença entre induções sem plasma seminal

Gráfico 4 - Efeito das incubações, com e sem plasma seminal, de diferentes espécies reativas de oxigênio e do subproduto da peroxidação lipídica sobre a atividade mitocondrial DAB IV



* diferença entre induções com e sem plasma seminal

AB diferença entre induções com plasma seminal

abc diferença entre induções sem plasma seminal

Tabela 4 - Efeito do plasma na incubação com ânion nas taxas de células móveis, vigor, integridade da membrana plasmática, espermatozoides com atividade mitocondrial DAB I, DAB II, DAB III e DAB IV, e fragmentação de DNA em sêmen equino - São Lourenço, MG - 2011

	Com plasma	Sem plasma	P
Motilidade (%)	30.76 ± 2.76	28.46 ± 2.55	0,5457
Vigor (0-5)	2.53 ± 0.14	2.61 ± 0.14	0,7054
Membrana Plasmática (%)	53.23 ± 2.89	50.07 ± 4.53	0,5638
DAB I (%)	43.07 ± 5.64	39.46 ± 3.82	0,6014
DAB II (%)	30.38 ± 2.85	37.61 ± 2.84	0,0853
DAB III (%)	11.76 ± 1.58	8.84 ± 1.24	0,1620
DAB IV (%)	14.76 ± 2.66	14.07 ± 2.51	0,8515
SCSA (%)	3.34 ± 1.16	3.09 ± 1.49	0,7321
Subdesenvolvida	0.15 ± 0.10	0	0,1654

Tabela 5 - Efeito do plasma na incubação com H₂O₂ nas taxas de células móveis, vigor, integridade da membrana plasmática, espermatozoides com atividade mitocondrial DAB I, DAB II, DAB III e DAB IV, e fragmentação de DNA em sêmen equino - São Lourenço, MG - 2011

	Com plasma	Sem plasma	P
Motilidade (%)	31.15 ± 2.05	30.38 ± 2.29	0,8050
Vigor (0-5)	2.61 ± 0.14	2.84 ± 0.10	0,2004
Membrana Plasmática (%)	52.61 ± 4.68	46.15 ± 5.43	0,3771
DAB I (%)	44.23 ± 5.60	42.76 ± 3.96	0,8333
DAB II (%)	33.00 ± 4.10	33.69 ± 2.95	0,8925
DAB III (%)	9.23 ± 1.29	8.76 ± 0.80	0,7646
DAB IV (%)	13.53 ± 2.24	14.76 ± 2.04	0,6892
SCSA (%)	3.44 ± 1.38	2.67 ± 0.92	0,8988
Subdesenvolvida	0	0.30 ± 0.17	0,1039

Não houve diferença nas amostras com e sem plasma seminal nas diferentes variáveis incubadas em sistema de geração de ânion superóxido (O₂⁻) e H₂O₂ (Tabelas 4 e 5).

Tabela 6 – Efeito do plasma na incubação com MDA nas taxas de células móveis, vigor, integridade da membrana plasmática, espermatozoides com atividade mitocondrial DAB I, DAB II, DAB III e DAB IV, e fragmentação de DNA em sêmen equino - São Lourenço, MG - 2011

	Com plasma	Sem plasma	P
Motilidade (%)	32.69 ± 2.01	5.76 ± 3.91	<.0001
Vigor (0-5)	2.76 ± 0.12	0.46 ± 0.31	<.0001
Membrana Plasmática (%)	51.07 ± 4.75	7.84 ± 4.90	<.0001
DAB I (%)	44.15 ± 5.12	9.23 ± 5.57	0,0001
DAB II (%)	31.76 ± 3.44	5.15 ± 3.50	<.0001
DAB III (%)	11.84 ± 1.70	1.00 ± 0.67	<.0001
DAB IV (%)	12.23 ± 1.95	84.61 ± 9.31	<.0001
SCSA (%)	3.99 ± 1.22	30.76 ± 11.42	0,0833
Subdesenvolvida	0.15 ± 0.10	0	0,1654

Verificou-se que nas amostras tratadas com MDA incubadas com plasma seminal houve um aumento significativo das características funcionais avaliadas das células em relação com a incubação sem plasma que foram inferiores aos espermatozoides. Uma menor porcentagem de espermatozoides móveis e de membrana íntegra foi observada nas amostras incubadas sem plasma quando comparada com tratamentos com plasma (5.76 ± 3.91 , 32.69 ± 2.01 , 7.84 ± 4.90 , 51.07 ± 4.75 , respectivamente; Tabela 6). Além disto, maiores taxas de fragmentação de DNA em espermatozoides e com nenhuma atividade mitocondrial foram observadas no grupo sem plasma em relação do grupo com plasma (30.76 ± 11.42 , 3.99 ± 1.22 , 84.61 ± 9.31 , 12.23 ± 1.95 , respectivamente; Tabela 6).

Tabela 7 – Efeito do plasma na incubação com radical hidroxil nas taxas de células móveis, vigor, integridade da membrana plasmática, espermatozoides com atividade mitocondrial DAB I, DAB II, DAB III e DAB IV, e fragmentação de DNA em sêmen equino - São Lourenço, MG - 2011

	Com plasma	Sem plasma	P
Motilidade (%)	23.07 ± 2.86	6.92 ± 0.90	<.0001
Vigor (0-5)	2.53 ± 0.14	1.38 ± 0.14	<.0001
Membrana Plasmática (%)	51.07 ± 3.37	50.23 ± 6.31	0,9072
DAB I (%)	13.00 ± 3.40	21.76 ± 4.49	0,1340
DAB II (%)	20.00 ± 1.67	18.84 ± 2.97	0,7392
DAB III (%)	5.61 ± 1.17	4.61 ± 1.37	0,5861
DAB IV (%)	61.38 ± 3.88	54.76 ± 4.28	0,2642
SCSA (%)	13.09 ± 6.12	92.70 ± 3.25	<.0001
Subdesenvolvida	0.07 ± 0.07	0.23 ± 0.12	0,2976

Nas amostras incubadas com radical hidroxil incubadas sem plasma seminal houve uma menor porcentagem de espermatozoides móveis em relação com a incubação com plasma (6.92 ± 0.90 , 23.07 ± 2.86 , respectivamente; Tabela 7). Da mesma forma, maiores taxas de fragmentação de DNA em espermatozoides

foram observadas no grupo sem plasma em relação do grupo com plasma (92.70 ± 3.25 , 13.09 ± 6.12 , respectivamente; Tabela 7).

Tabela 8 - Efeito do plasma nas alterações morfológica, nas taxas de espermatozoides com acrossomo íntegro e susceptibilidade ao estresse oxidativo em sêmen equino - São Lourenço, MG - 2011

	Com plasma	Sem plasma	P
Integridade acrossomal (%)	74.11 \pm 1.57	73.38 \pm 2.00	0,9287
MDA sptz (ng/10⁶sptz)	30.04 \pm 3.85	22.25 \pm 3.48	0,1085
Estreita na base	0.28 \pm 0.11	0.19 \pm 0.08	0,5050
Contorno anormal	0.19 \pm 0.06	0.03 \pm 0.02	0,0252
Solta anormal	0.09 \pm 0.04	0.03 \pm 0.02	0,3097
Formas duplas	0.28 \pm 0.09	0.25 \pm 0.07	0,7561
Acrossomo	0.01 \pm 0.01	0.01 \pm 0.01	1,0000
Cauda dobrada com gota	1.67 \pm 0.37	1.26 \pm 0.41	0,4741
Cauda fortemente enrolada	0.96 \pm 0.17	1.00 \pm 0.16	0,8718
Cauda fortemente dobrada	12.32 \pm 1.44	12.30 \pm 1.44	0,9925
Gota proximal	9.00 \pm 1.08	7.73 \pm 1.05	0,4041
Gigante	0.03 \pm 0.02	0.15 \pm 0.07	0,1507
Inserção abaxial	4.17 \pm 0.97	4.21 \pm 1.21	0,9803
Solta normal	0.50 \pm 0.13	0.46 \pm 0.13	0,8401
Inserção oblíqua	0.94 \pm 0.29	0.09 \pm 0.04	0,0061
Inserção retroaxial	0.13 \pm 0.04	0.13 \pm 0.04	1,0000
Cauda enrolada	0.86 \pm 0.19	0.76 \pm 0.22	0,7485
Cauda dobrada	4.19 \pm 0.43	4.36 \pm 0.54	0,8044
Gota distal	2.00 \pm 0.40	1.63 \pm 0.39	0,5216
Normais	62.36 \pm 1.84	65.46 \pm 2.02	0,1992

Tabela 9 – Efeito das incubações com diferentes espécies reativas de oxigênio e do subproduto da peroxidação lipídica (Ânion: ânion superóxido; H₂O₂: peróxido de hidrogênio; MDA: malondialdeído; Hidroxil: radical hidroxil) nas alterações morfológicas, integridade acrossomal e susceptibilidade ao estresse oxidativo em sêmen equino - São Lourenço, MG - 2011

	Ânion	H ₂ O ₂	MDA	Radical Hidroxil
Integridade Acrossomal (%)	73.11 ± 2.00	73.76 ± 2.08	71.50 ± 3.44	76.61 ± 2.38
MDASptz (ng/10⁶sptz)	21.30 ± 3.41 ^{ab}	24.20 ± 3.85 ^{ab}	16.33 ± 8.56 ^b	34.73 ± 6.32 ^a
Estreita na base	0.34 ± 0.19	0.38 ± 0.17	0.11 ± 0.08	0.11 ± 0.06
Contorno anormal	0 ^b	0.11 ± 0.06 ^{ab}	0.19 ± 0.09 ^a	0.15 ± 0.07 ^{ab}
Solta anormal	0.03 ± 0.03	0.11 ± 0.08	0.07 ± 0.05	0.03 ± 0.03
Formas duplas	0.34 ± 0.14	0.19 ± 0.11	0.19 ± 0.09	0.34 ± 0.13
Acrossomo	0	0.03 ± 0.03	0.03 ± 0.03	0
Cauda dobrada c/ gota	1.84 ± 0.64 ^{ab}	2.38 ± 0.80 ^a	0.96 ± 0.32 ^{ab}	0.69 ± 0.22 ^b
Cauda fortemente enrolada	0.92 ± 0.25	0.88 ± 0.20	1.03 ± 0.24	1.07 ± 0.24
Cauda fortemente dobrada	12.61 ± 1.66	12.69 ± 2.06	10.80 ± 2.14	13.15 ± 2.31
Gota proximal	10.07 ± 1.36 ^a	10.00 ± 1.62 ^a	9.07 ± 1.57 ^a	4.30 ± 1.24 ^b
Gigante	0.11 ± 0.11	0.07 ± 0.05	0.19 ± 0.09	0
Inserção abaxial	5.03 ± 1.75	3.84 ± 1.47	3.11 ± 1.27	4.76 ± 1.70
Solta normal	0.34 ± 0.16	0.73 ± 0.25	0.42 ± 0.17	0.42 ± 0.14
Inserção oblíqua	0.57 ± 0.28	0.69 ± 0.31	0.38 ± 0.34	0.42 ± 0.28
Inserção retroaxial	0.11 ± 0.06	0.11 ± 0.06	0.07 ± 0.05	0.23 ± 0.08
Cauda enrolada	0.57 ± 0.17	1.11 ± 0.48	0.96 ± 0.23	0.61 ± 0.18
Cauda dobrada	4.42 ± 0.66	4.15 ± 0.58	3.92 ± 0.82	4.61 ± 0.70
Gota distal	2.38 ± 0.77	2.03 ± 0.53	2.00 ± 0.48	0.84 ± 0.39
Normais	60.26 ± 2.65 ^b	60.65 ± 2.57 ^b	66.38 ± 2.66 ^{ab}	68.34 ± 2.86 ^a

a,b,c: letras diferentes indicam diferença estatística (p<0,05)

As diferenças encontradas em algumas anormalidades espermáticas frente às diferentes espécies reativas de oxigênio ocorreram apenas naqueles defeitos com baixa prevalência (Tabelas 8 e 9).

7 DISCUSSÃO

Observamos que, nas amostras incubadas com as espécies reativas de oxigênio e malondialdeído na presença de plasma seminal, o radical hidroxil apresentou-se mais deletério do que as outras induções. De fato, esta espécie reativa de oxigênio é considerada a mais instável e que, portanto, apresenta maior reatividade (capacidade de receber e doar elétrons). Neste contexto, o radical hidroxila é potencialmente o mais lesivo aos compostos biológicos que as demais EROs. A sua formação em sistemas biológicos advém das reações de Fenton e HBER-WEISS, as quais ocorrem através da reação entre uma molécula de peróxido de hidrogênio e uma molécula de Fe^{2+} ou Cu^+ , metais de transição que estão geralmente ligados à proteínas como a ferritina (ARUOMA et al., 1989; NICHI, 2003; RODRIGUES, 2009). A proteção enzimática é fundamental uma vez que cliva o peróxido de hidrogênio através da enzima catalase e do sistema enzimático glutaciona peroxidase/glutaciona redutase (KANKOFER et al., 2005) impedindo a formação do radical hidroxil. Entretanto, moléculas que aprisionam em sítios os metais de transição (tal como lactoferrina) e antioxidantes não enzimáticos (tal como o sistema vitamina E e ascorbato) parecem exercer proteção acessória contra estresse oxidativo causado pelo radical hidroxila. Visto que o espermatozoide é uma célula com citoplasma muito restrito e com maquinaria para síntese de biomoléculas quase nula, é extremamente dependente de proteção antioxidante extracelular proveniente do plasma seminal (RODRIGUES, 2009). Além disto, a membrana espermática apresenta grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados, ricos em duplas ligações (i.e., insaturações) (PARKS; HAMMERSTEDT, 1985). A presença destes ácidos graxos é extremamente importante para que o espermatozoide apresente uma membrana mais fluida, fundamental para a mobilidade celular e nos processos de fertilização (LANGLAIS; ROBERTS, 1985; LADHA, 1998). No entanto, as ligações carbono-hidrogênio, adjacentes a estas ligações duplas, são mais instáveis e mais vulneráveis ao ataque das EROs, resultando na formação de produtos tóxicos aos sistemas biológicos, sendo o malondialdeído o principal produto da peroxidação lipídica (VERNET; AITKEN; DREVET, 2004; NICHI et al., 2007). O plasma seminal contém uma gama de substâncias nutritivas e protetoras, que podem estar atuando como moduladores

das condições para reação de Fenton. Seu efeito sobre o *status* oxidativo e funcional dos espermatozoides pode ser observado no presente experimento (motilidade com e sem plasma: 23.07 ± 2.86 , 6.92 ± 0.90 , SCSA™ com e sem plasma: $13,09 \pm 6,12$, 92.70 ± 3.25 , respectivamente).

Por outro lado, nas amostras incubadas sem o plasma seminal, houve uma maior susceptibilidade das células ao MDA, produto do ataque das EROs a lipídios, substância tóxica capaz de prejudicar vários mecanismos fisiológicos do corpo humano através de sua capacidade de reagir com biomoléculas (DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005; VALKO et al., 2007). Por isso, é fundamental considerar esta molécula como algo mais do que um marcador da peroxidação lipídica, mas sim um indicativo de alto risco de mutação (MARNETT, 1999).

O MDA apresenta alta reatividade e longevidade, além da capacidade em atuar dentro e fora das células, interagindo com biomoléculas, tais como ácidos nucleicos e proteínas causando danos irreversíveis nos mecanismos celulares. O produto principal desta reação é conhecido como *pyrimido[1,2- α]purin-10(3H)-one* (M₁G) que está em equilíbrio com a forma de N² - oxopropenil - guanosina aberta. O mecanismo proposto para esta mutação indica claramente que M₁G é capaz de induzir mutações chamadas de “*frame-shift*”, nas quais ocorrem inserções ou deleções dos pares de bases nitrogenadas. Além disso, um mecanismo alternativo de genotoxicidade envolve a capacidade do MDA em criar ligações cruzadas intercadeias no DNA que têm efeitos biológicos potentes (DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005).

De fato, diversos estudos relacionam o MDA como fator importante na etiologia de diversos eventos patológicos. Por ser um potente agente neurotóxico e apresentar meia vida maior do que as espécies reativas de oxigênio (ESTERBAUER; SCHAUR; ZOLLNER, 1991), o seu acúmulo é crítico na patogênese do envelhecimento (NG et al., 2005), isquemia cerebral e várias doenças neurodegenerativas, incluindo a doença de Alzheimer (LOVELL; MARKESBERY, 2007), doença de Parkinson e esclerose amiotrófica (SMITH, Y. et al., 2012). Seus níveis estão elevados drasticamente em tecidos cerebrais (NG et al., 2005; BERGAMINI; SEGHERI, 2006;; UTTARA et al., 2009). O MDA é tóxico a vários tipos de células *in vitro*, incluindo eritrócitos humanos (ALLEGRA et al., 2002), neurônios cultivados do hipocampo (CHENG et al., 2011), células endoteliais

(HIPKISS, 2005) e fibroblastos (RITTIÉ et al., 2002). No entanto, o mecanismo detalhado desta toxicidade não está totalmente elucidado.

Sabe-se que o plasma seminal apresenta uma variada composição de proteínas, seminolípedes, gorduras, açúcares e proteínas sendo identificadas em trabalhos prévios com Mangalarga Marchador (ZAHN, 2006). Dentre as proteínas presentes no plasma seminal de garanhões que poderiam ser responsáveis pelos resultados encontrados no presente experimento, a carnosina é uma possibilidade. Ela é uma proteína relatada em diversos estudos como a principal responsável pela proteção contra o acúmulo de MDA e seus efeitos deletérios (HIPKISS et al., 1997, 1998; GUIOTTO et al., 2007; CHENG et al., 2011). De fato, esta proteína foi identificada no sêmen de algumas espécies como suínos, ovinos (DUCCI et al., 2006) e garanhões (DUCCI et al., 2005).

A carnosina é um dipeptídeo, composto de β -alanina e L-histidina, que em mamíferos é encontrada no músculo esquelético, bulbo olfatório, regiões do cérebro e em outros tecidos e fluidos corporais (BOLDYREV; ALDINI; DERAIVE, 2013). A carnosina é considerada um agente anti-oxidante e eliminador de radicais livres, tampão fisiológico, neurotransmissor, quelante de metais, imunostimulante e atua na regeneração tecidual (CHENG et al., 2011). Uma das formas de atuação da carnosina ocorre através da diminuição da velocidade de senescência e aumento no tempo de vida (limite de Hayflick) de culturas de fibroblastos humanos, além de inibir seletivamente o crescimento de cultura de células neoplásicas (HIPKISS et al., 1998). De acordo com a teoria de Hayflick, as células possuem um número máximo de divisões mitóticas possíveis. Isso ocorre, pois, a cada divisão celular, ocorre um encurtamento dos telômeros associados ao DNA. Desta forma, após certo número de divisões, a célula entra em senescência (HAYFLICK, 1965). Estudos indicam que a carnosina é capaz de aumentar o limite de Hayflick (MCFARLAND; HOLLIDAY, 1994), e diminuir a velocidade de encurtamento telomérico (SHAO; LI; TAN, 2004). Por esta característica a carnosina tem sido chamada de proteína antienvelhecimento.

Uma série de modificações nas proteínas após a síntese (e.g., desaminação, oxidação e glicação não-enzimática) é característica de envelhecimento e doenças relacionadas a estes processos. Os produtos avançados de glicação (AGEs *advanced glycation end-products*) são formados por meio da reação de glicação não enzimática de escurecimento, também conhecida como reação de Maillard. Trata-se

de uma grande variedade de substâncias formadas a partir de uma reação caracterizada pela junção do grupo aldeído dos açúcares redutores com o grupo amino das proteínas, de peptídios ou de aminoácidos (HIPKISS et al., 1998). Esta reação forma complexos intermediários que formam, no final da reação, complexos de cor marrom que se depositam nos tecidos. A reação de Maillard, primeiramente estudada na indústria alimentícia, é a responsável pelo aspecto dourado dos alimentos após assados. No entanto, devido aos altos índices de glicose encontrados nos pacientes, diversos estudos passaram a comprovar a participação fundamental da reação de Maillard em processos de envelhecimento precoce em pacientes diabéticos (BROWNLEE; VLASSARA; CERAMI, 1984). Posteriormente, diversos estudos convergiram para a conclusão que as reações de *cross-linking* de proteínas (ligações entre moléculas lineares produzindo polímeros tridimensionais com alta massa molar e conseqüentemente tornando sua estrutura mais rígida) induzidas por carboidratos são diretamente responsáveis pelo envelhecimento mesmo em pacientes não diabéticos (CERAMI, 1985). De fato os AGEs tem sido relatados como principais fatores no desenvolvimento de doenças tais como a doença de Alzheimer (SMITH et al., 1995), osteoporose (RONCERO-RAMOS et al., 2013), aterosclerose (THORPE; BAYNES, 1996), glaucoma (TEZEL; LUO; YANG, 2007), degeneração macular (STITT, 2005), entre outras.

Alguns estudos indicam que o malondialdeído pode exacerbar os efeitos deletérios da reação de Maillard (GOMEZSANCHEZ; HERMOSIN; MAYA, 1992), e que produtos intermediários desta reação podem coexistir e reagir com o MDA, formando subprodutos ainda mais tóxicos, especialmente em ambientes ricos em lipídeos (SCHUTT et al., 2003).

Neste contexto, estudos indicam que a carnosina atenua a lesão celular induzida tanto pela reação de Maillard (ALHAMDANI; AL-AZZAWIE; ABBAS, 2007) como pelo MDA (GUIOTTO et al., 2007). A proteção da carnosina contra os danos induzidos pelo MDA é mediada pela reação desta proteína com o aldeído, evitando os danos a proteínas importantes. Efeito semelhante é observado quando os aldeídos de açúcares redutores são utilizados para provocar a *cross-linking* de proteínas, provavelmente por causa da semelhança do dipeptídeo para alguns sítios de glicação de proteínas preferenciais (HIPKISS et al., 1998). De fato, parece não ser uma coincidência que a estrutura da carnosina se assemelhe às da lisina e histidina, os resíduos de aminoácidos mais prontamente oxidáveis durante o

envelhecimento protéico (HIPKISS et al., 1998). Além disto, a estrutura da carnosina torna este peptídeo prontamente glicável por aldeídos de açúcar. A carnosina se prende aos aldeídos derivados da peroxidação lipídica, trabalhando como nucleófilos sacrificiais 'aldeído sequestrantes', e macromoléculas celulares, atenuando desta forma os danos e progressão do processo oxidativo (BURCHAM et al., 2002).

Era esperado que a maior lesão à cromatina ocorresse com a indução do radical hidroxil que é o mais reativo das biomoléculas. De fato, isto ocorreu nas amostras com a presença de plasma seminal. Neste caso, a lesão de DNA pode ser atribuída ao ataque do radical hidroxil que cliva o DNA devido ao ataque das pontes de dissulfeto presentes na estrutura dupla helicoidal da cromatina. A fragmentação de DNA induzida pelo radical hidroxil resulta na formação das moléculas 8-OH-guanosina e 8-OH-2'-desoxiguanina em uma primeira fase, seguida por uma fragmentação de DNA de fita dupla. Enquanto os danos de DNA da primeira fase poderiam ser reparados pelo oócito, os danos de fita dupla são irreversíveis e incompatíveis com os processos de fertilização. Portanto a presença de danos extensos na fita dupla de DNA e os altos níveis de 8-OH-guanosina e 8-OH-2'-desoxiguanina induzidos pelo radical hidroxila durante o transporte dos espermatozoides através dos túbulos seminíferos e epidídimo poderia comprometer gravemente o desenvolvimento embrionário e o desenvolvimento de uma gestação viável. No entanto, mesmo que os danos induzidos por este radical não sejam significativos, a probabilidade de uma gestação ser viável ainda dependerá de outros fatores como: a porcentagem de células com DNA fragmentado, a extensão do dano de DNA por célula, os níveis de 8-OH-guanosina e 8-OH-2'-desoxiguanina, as regiões do DNA que estão danificadas (introns x exons) e a capacidade do oócito de reparar este dano (ALVAREZ, 2005).

Apesar do radical hidroxila ser extremamente lesivo ao DNA, como já era esperado, ao retirar o plasma seminal das amostras incubadas com MDA, observamos um aumento significativo da porcentagem de espermatozoides susceptíveis a desnaturação ácida da cromatina. Provavelmente isso ocorreu devido à ausência de substâncias tais como a carnosina, presente no plasma seminal, que inibiriam o efeito tóxico do malondialdeído assim como sua reação com produtos da reação de Maillard, que geraria compostos ainda mais tóxicos. De fato, Baumber et al. (2003) demonstraram o efeito tóxico do MDA ao espermatozoide equino e sua

capacidade de induzir a fragmentação do DNA espermático, como consequência do estresse oxidativo.

Estudos demonstram que o acúmulo de proteínas do grupo carbonila está associado ao estresse oxidativo, sendo que, estas proteínas, assim como o MDA são consideradas biomarcadores deste estresse (DALLE-DONNE et al., 2003). De fato, o grupo carbonila está relacionado com os danos oxidativos a neurônios causados pelo MDA, desencadeando um influxo e sobrecarga de cálcio, mecanismos relacionados ao estresse oxidativo de origem mitocondrial, podendo agravar tais danos (CAI et al., 2009; PENG; JOU, 2010). Em concordância a estes achados, em isolados mitocondriais *in vitro* de neurônios de ratos, o MDA deprimiu o potencial de membrana mitocondrial, inibiu o complexo mitocondrial I e II do processo de fosforilação oxidativa e elevou os níveis de espécies reativas de oxigênio mitocondriais (LONG et al., 2009), o que contribuiria para a nova produção de MDA, gerando uma reação em progressão geométrica (ciclo de *feedback* positivo de geração MDA induzida pelo MDA é mais marcante, porque a meia-vida do MDA é maior do que as espécies reativas de oxigênio que são facilmente eliminados) (CHENG et al., 2011). De fato, no presente experimento, as amostras incubadas com MDA sem a presença de plasma seminal, apresentaram uma marcante depressão da atividade mitocondrial caracterizada pela diminuição nas células DABI (alta atividade mitocondrial) e um aumento significativo dos espermatozoides com DAB IV (ausência de atividade mitocondrial; DAB I - O_2^- : $39,46 \pm 3,82^a$; H_2O_2 : $42,76 \pm 3,96^a$; MDA: $9,23 \pm 5,57^b$; OH^- : $21,76 \pm 4,49^b$; DAB IV - O_2^- : $14,07 \pm 2,51^c$; H_2O_2 : $14,76 \pm 2,04^c$; MDA: $84,61 \pm 9,31^a$; OH^- $54,76 \pm 4,28^b$).

Este efeito pode ser atribuído, pela interação do MDA com grupos amino, fosfolípidos e proteínas de membranas formando produtos secundários que se depositam nas células em regiões em alta atividade citoquímica como o citosol mitocondrial. Esses conjugados, com destaque para as lipofuscinas, desempenham tal papel em função de sua deposição ocorrer em ultra-estruturas como mitocôndrias. Em adição, vale ressaltar que a lipofuscina é um marcador de célula senescente, material polimérico intralisossômico que não pode sofrer exocitose ou ser degradado, e continuamente é acumulado durante o tempo de vida de uma célula, sugerindo que sua formação é governada pelas EROs (CHOWDHURY et al., 2004).

A carnosina retarda a senescência pois suprime intracelularmente os efeitos deletérios das proteínas do grupo carbonila, reagindo com eles de modo a formar proteínas carnosiniladas, que tem seu destino muito discutido, incluindo a formação de lipofuscina e proteólise através de proteossoma. A lipofuscina formada entre carbonilas de proteínas / lipídios e carnosina é inerte, ao passo que a forma gerada em ausência de carnosina seria capaz de reagir com outras macromoléculas celulares, através dos grupos de carbonilas (BROWNSON; HIPKISS, 2000). Portanto a retirada do plasma seminal e conseqüentemente da carnosina justificaria o efeito deletério do malondialdeído sobre a atividade mitocondrial.

Esperava-se que a presença do plasma seminal fosse marcante na manutenção das funções celulares em contato com todas as espécies reativas de oxigênio, no entanto, nas incubações com ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, mesmo sem a presença do plasma seminal, tais espécies reativas não foram significativamente deletérias. No entanto não podemos afirmar a ausência de danos causados por estas EROs, já que a ausência de um grupo controle no presente experimento não permitiria tal suposição.

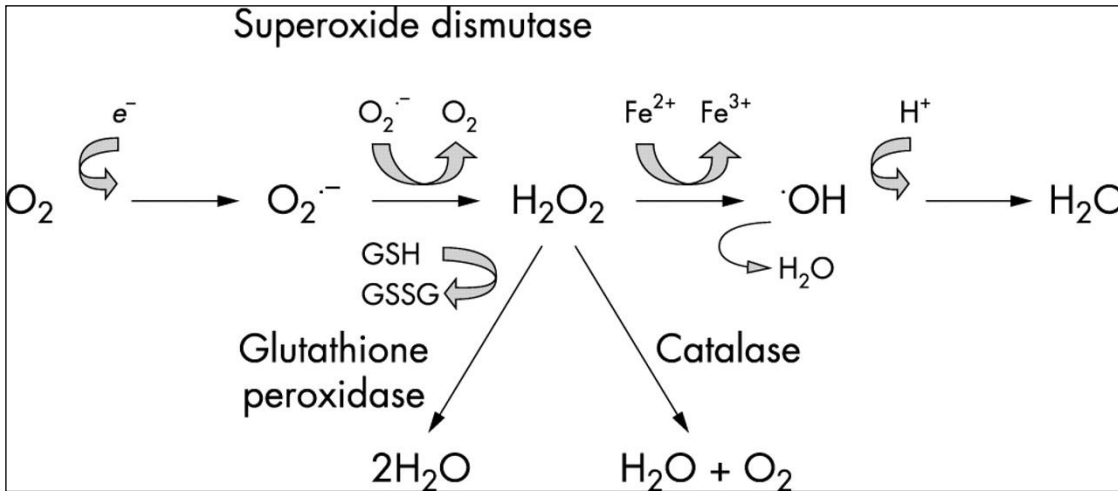
O ânion superóxido, gerado a partir da molécula de oxigênio pela adição de um elétron, não é altamente reativo, pois não consegue penetrar em membranas lipídicas, ficando restrito ao compartimento onde é produzido. A formação do superóxido acontece espontaneamente, especialmente no ambiente aeróbico, rico em elétrons, próximo à membrana mitocondrial interna, que ocorre devido ao escape de elétrons da cadeia respiratória (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

Os mecanismos antioxidantes que protegem o espermatozoide contra os danos do ânion superóxido e o H_2O_2 são os enzimáticos, que atuam em cascata (Figura 2), sendo que, a superóxido dismutase provoca a dismutação do ânion superóxido (O_2^-), provocando a formação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que apesar de não ser um radical livre, exerce efeitos citotóxicos (KANKOFER et al., 2005). Este, por sua vez, pode ser destruído pela catalase ou pelo sistema glutaciona peroxidase/glutaciona redutase (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1985), evitando a formação do radical hidroxila (OH^-), considerada a ERO mais prejudicial ao espermatozoide (HALLIWELL, 1991). Em adição, possivelmente os espermatozoides equinos são resistentes aos ataques do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio nestas concentrações, pois independem da ação protetora antioxidante do plasma seminal. Diferente do que acontece em humanos, segundo

Armstrong et al. (1991), eles sugerem que o H_2O_2 é a ERO que causa mais danos aos espermatozoides *in vitro*, principalmente devido à sua alta capacidade em penetrar membranas biológicas, por ter uma meia vida mais longa que o radical hidroxila, agindo por um período mais prolongado e por possuir função deletéria em relação aos níveis intracelulares de ATP ocasionando a diminuição da motilidade espermática.

De fato, estudos realizados em nosso laboratório vêm demonstrando que há uma variação na susceptibilidade da célula espermática as diferentes EROs dependendo da espécie animal envolvida e condição biológica (por exemplo, amostras com plasma seminal x sem plasma ou amostras *in natura* x criopreservadas). Tais estudos objetivam um tratamento antioxidante direcionado, dependendo da ERO envolvida considerada mais deletéria. Esta etapa é essencial para eficiência de um tratamento antioxidante já que cada antioxidante possui predileção por um determinado agente pró-oxidativo (NORDBERG; ARNÉR, 2001). No entanto, a eficiência deste procedimento depende de uma série de outros fatores. É necessário, por exemplo, que o sistema alvo esteja em estresse oxidativo, ou seja, sob ação de uma quantidade de EROs que sobrepuje a capacidade antioxidante de tal sistema (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1985; NICHI, 2009). Além disso, o estudo adequado da dose é essencial, já que uma quantidade exacerbada de antioxidantes pode exercer um efeito inibitório do papel fisiológico das EROs e conseqüentemente bloquear eventos importantes da fisiologia espermática e dos processos de fertilização (DE LAMIRANDE et al., 1997; NICHI et al., 2007). Portanto o presente estudo pode preceder futuros experimentos envolvendo o tratamento antioxidante do sêmen equino que podem ser aplicados, por exemplo, em algumas biotecnologias do sêmen, tais como a refrigeração e criopreservação espermática, já que estas técnicas possuem a capacidade de induzir o estresse oxidativo seminal (BAILEY; BLODEAU; CORMIER, 2000; AGARWAL; SAID, 2005; THOMSON et al., 2009).

Figura 2 - Cadeia de formação das EROs e a destruição pelos seus respectivos antioxidantes enzimáticos



Fonte: (NELDELJKIVIC; GOKCE; LOSCALZO, 2003).

As diferenças encontradas em algumas anormalidades espermáticas frente às diferentes espécies reativas de oxigênio, como as alterações de cauda dobrada com gota e gota proximal, têm sua origem no testículo, ou seja, antes que qualquer efeito advindo da manipulação do sêmen possa ser observado. O projeto foi realizado na contra estação e sabidamente a concentração de testosterona está menor. Com menos testosterona no parênquima testicular a fagocitose de células anormais pelas células de sertoli está tão diminuída quanto a liberação de espermatozoides no epidídimo. Este evento é observado pela diminuição da libido, da concentração espermática, do aumento das alterações morfológicas características de reprodutores estacionais fora da temporada de monta (BLOTTNER et al., 2001; JANETT et al., 2003).

8 CONCLUSÕES

A susceptibilidade do espermatozoide equino ao estresse oxidativo é variável de acordo com a espécie reativa de oxigênio empregada na incubação; as espécies mais deletérias no presente experimento foram a malondialdeído e principalmente o radical hidroxil o que já era esperado.

Houve um efeito benéfico quanto a manutenção das funções celulares e *status* oxidativo em amostras cujo plasma seminal foi preservado. A proteção atribuída ao plasma seminal influenciou parâmetros como atividade mitocondrial, susceptibilidade a denaturação ácida da cromatina e índice de peroxidação lipídica. O plasma seminal exerceu mais pronunciada proteção aos eventos desencadeados pela malondialdeído.

A composição de muitas moléculas presentes no plasma seminal ainda é desconhecida então não se descarta a possível ação antioxidante de qualquer dessas moléculas. Estudos futuros envolvendo tanto a susceptibilidade ao ataque da EROs e composição bioquímica do plasma seminal equino se fazem necessários para se estabelecer a fisiologia e metaboloma do plasma seminal.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; SAID, T. M. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. **BJU International**, v. 95, n. 4, p. 503-507, 2005.

AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SIKKA, S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v. 18, n. 3, p. 325-332, 2006.

AITKEN, R. J.; DE IULIIS, G. N. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, n. 1, p. 3-13, 2010.

ALHAMDANI, M. S. S.; AL-AZZAWIE, H. F.; ABBAS, F. K. H. Decreased formation of advanced glycation end-products in peritoneal fluid by carnosine and related peptides. **Peritoneal Dialysis International**, v. 27, n. 1, p. 86-89, 2007.

ALLEGRA, M.; GENTILE, C.; TESORIERE, L.; LIVREA, M. A. Protective effect of melatonin against cytotoxic actions of malondialdehyde: an in vitro study on human erythrocytes. **Journal of Pineal Research**, v. 32, n. 3, p. 187-193, 2002.

ALMEIDA, J.; BALL, B. A. Effect of α -tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 87, n. 3, p. 321-337, 2004.

ALVARENGA, M. **Melhoria da resistência espermática à congelação e diminuição das variações entre raças e indivíduos com o uso da dimetilformamida para semen de garanhões**. 2002. 87 p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Botucatu, 2002.

ALVARENGA, M.; PAPA, F. Principais problemas reprodutivos observados em garanhões no Brasil. **Brazilian Journal of Equine Medicine**, v. 14, p. 26-29, 2007.

ALVAREZ, J. G. The predictive value of sperm chromatin structure assay. **Human Reproduction**, v. 20, n. 8, p. 2365-2367, 2005.

AMANN, D. P., GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. (Ed.). **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1992. p. 715-745.

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 3, p. 145-173, 1987.

ARAÚJO, E. B.; SOUZA, G. V.; SILVA, J. F. S.; FAGUNDES, B. Análise e caracterização do perfil protéico do plasma seminal e espermatozóides de eqüinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 294, 2005.

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, 1991.

ARUOMA, O. I.; HALLIWELL, B.; LAUGHTON, M. J.; QUINLAN, G. J.; GUTTERIDGE, J. M. The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron(II)-iron(III) complex. **Biochemical Journal**, v. 258, n. 2, p. 617-620, 1989.

AURICH, J. E.; KÜHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. **Theriogenology**, v. 46, n. 5, p. 791-797, 1996.

BAILEY, J. L.; BLODEAU, J.-F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon minireview. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 1, p. 1-7, 2000.

BALL, B. A.; VO, A. T.; BAUMBER, J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. **American Journal Veterinary Research**, v. 62, n. 4, p. 508-515, 2001.

BALL, B. A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3-4, p. 257-267, 2008.

BARTH, A. D.; OKO, R. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: Iowa State University Press, 1989.

BAUMBER, J.; BALL, B. A.; GRAVANCE, C. G.; MEDINA, V.; DAVIES-MOREL, M. C. G. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 6, p. 895-902, 2000.

BAUMBER, J.; BALL, B. A.; LINFOR, J. J.; MEYERS, S. A. Reactive oxygen species and cryopreservation promote dna fragmentation in equine spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 24, n. 4, p. 621-628, 2003.

BERGAMINI, C. M.; SEGHIERI, G. ROS and kidney disease in the evolution from acute phase to chronic end stage disease: a commentary on "oxidative signaling in renal epithelium: critical role of cPLA2 and p38SAPK". **Free Radical Biology and Medicine**, v. 41, n. 2, p. 190-192, 2006.

BLOTTNER, S.; WARNKE, C.; TUCHSCHERER, A.; HEINEN, V.; TORNER, H. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. **Animal Reproduction Science**, v. 65, n. 1-2, p. 75-88, 2001.

BOLDYREV, A. A.; ALDINI, G.; DERAIVE, W. Physiology and pathophysiology of carnosine. **Physiological Reviews**, v. 93, p. 1803-1845, 2013.

BROWNLEE, M.; VLASSARA, H.; CERAMI, A. Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications. **Annals Internal Medicine**, v. 101, n. 4, p. 527-537, 1984.

BROWNSON, C.; HIPKISS, A. R. Carnosine reacts with a glycated protein. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, n. 10, p. 1564-1570, 2000.

BURCHAM, P. C.; KAMINSKAS, L. M.; FONTAINE, F. R.; PETERSEN, D. R.; PYKE, S. M. Aldehyde-sequestering drugs: tools for studying protein damage by lipid peroxidation products. **Toxicology**, v. 181-182, p. 229-236, 2002.

BURNAUGH, L.; BALL, B. A.; SABEUR, K.; THOMAS, A. D.; MEYERS, S. A. Osmotic stress stimulates generation of superoxide anion by spermatozoa in horses. **Animal Reproduction Science**, v. 117, n. 3-4, p. 249-260, 2010.

CAI, J., CHEN, J., HE, H., YIN, Z., ZHU, Z., YIN, D. Carbonyl stress: malondialdehyde induces damage on rat hippocampal neurons by disturbance of Ca(2+) homeostasis. **Cell Biology and Toxicology**, v. 25, p. 435-445, 2009.

CERAMI, A. Hypothesis - glucose as a mediator of aging. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 33, n. 9, p. 626-634, 1985.

CHENG, J.; WANG, F.; YU, D. F.; WU, P. F.; CHEN, J. G. The cytotoxic mechanism of malondialdehyde and protective effect of carnosine via protein cross-linking/mitochondrial dysfunction/reactive oxygen species/MAPK pathway in neurons. **European Journal of Pharmacology**, v. 650, n. 1, p. 184-194, 2011.

CHIA, S.-E.; ONG, C.-N.; CHUA, L.-H.; HO, L.-M.; TAY, S.-K. Comparison of zinc concentrations in blood and seminal plasma and the various sperm parameters between fertile and infertile men. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 1, p. 53-57, 2000.

CHOWDHURY, P. K.; HAIDER, M.; CHOUDHURY, P. K.; KRAUS, G. A.; DESAI, M. J.; ARMSTRONG, D. W.; CASEY, T. A.; RASMUSSEN, M. A.; PETRICH, J. W. Generation of fluorescent adducts of malondialdehyde and amino acids: toward an understanding of lipofuscin. **Photochemistry Photobiology**, v. 79, n. 1, p. 21-25, 2004.

DALLE-DONNE, I.; ROSSI, R.; GIUSTARINI, D.; MILZANI, A.; COLOMBO, R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, n. 1-2, p. 23-38, 2003.

DARIN-BENNETT, A.; POULOS, A.; WHITE, I. The effect of cold shock and freeze-thawing on release of phospholipids by ram, bull, and boar spermatozoa. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 6, p. 1409-1420, 1973.

DE LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v. 2, n. 1, p. 48-54, 1997.

DELL'AQUA JR., J. A. **Efeito da cortico-terapia e plasma seminal na resposta inflamatória e fertilidade de éguas submetidas à inseminação artificial.** Botucatu, 2004. 101 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

DEL RIO, D.; STEWART, A. J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 15, n. 4, p. 316-328, 2005.

DUCCI, M.; GAZZANO, A.; PACCHINI, S.; NICCOLINI, A.; VITALE, A.; MARTELLI, F.; GADEA, J. Quantitative determination of imidazole dipeptides in stallion spermatozoa and seminal plasma. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, p. 379, 2005.

DUCCI, M.; PACCHINI, S.; NICCOLINI, A.; GAZZANO, A.; CERRI, D.; GADEA, J.; BOBOWIEC, R.; SIGHIERI, C.; MARTELLI, F. Concentrations of carnosine, anserine, L-histidine and 3-methyl histidine in boar spermatozoa and sheep milk by a modified HPLC method. **Polish Journal Veterinary Sciences**, v. 9, n. 3, p. 159-163, 2006.

EGGERT-KRUSE, W.; ZWICK, E.-M.; BATSCHULAT, K.; ROHR, G.; ARMBRUSTER, F. P.; PETZOLDT, D.; STROWITZKI, T. Are zinc levels in seminal plasma associated with seminal leukocytes and other determinants of semen quality? **Fertility Sterility**, v. 77, n. 2, p. 260-269, 2002.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 11, n. 1, p. 81-128, 1991.

EVENSON, D. P.; JOST, L. K.; MARSHALL, D.; ZINAMAN, M. J.; CLEGG, E.; PURVIS, K.; DE ANGELIS, P.; CLAUSSEN, O. P. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. **Human Reproduction**, v. 14, n. 4, p. 1039-1049, 1999.

FARNAUD, S.; EVANS, R. W. Lactoferrin—a multifunctional protein with antimicrobial properties. **Molecular Immunology**, v. 40, n. 7, p. 395-405, 2003.

FUSE, H.; KAZAMA, T.; OHTA, S.; FUJIUCHI, Y. Relationship between zinc concentrations in seminal plasma and various sperm parameters. **International Urology and Nephrology**, v. 31, n. 3, p. 401-408, 1999.

GATTI, J. L.; CASTELLA, S.; DACHEUX, F.; ECROYD, H.; MÉTAYER, S.; THIMON, V.; DACHEUX, J. L. Post-testicular sperm environment and fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 82–83, p. 321-339, 2004.

GOMES, G. M.; GOMES, L. P. Problemas e soluções com o uso de sêmen congelado e refrigerado de garanhões da raça Mangalarga Marchador. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 18., 2009, Belo Horizonte, MG. **Anais ...** Belo Horizonte: CBRA, 2009.

GOMES, G.; JACOB, J.; MEDEIROS, A.; PAPA, F.; ALVARENGA, M. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed. **Theriogenology**, v. 58, n. 2-4, p. 277-279, 2002.

GOMEZSANCHEZ, A.; HERMOSIN, I.; MAYA, I. Synthesis of the maillard reaction .2. Influence of malondialdehyde on the maillard degradation of amadori compounds. **Carbohydrate Research**, v. 229, n. 2, p. 307-322, 1992.

GUIOTTO, A.; RUZZA, P.; BABIZHAYEV, M. A.; CALDERAN, A. Malondialdehyde scavenging and aldose-derived Schiff bases' transglycation properties of synthetic histidyl-hydrazide carnosine analogs. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 18, p. 6158-6163, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free radicals in biology and medicine**: [S.l]: Pergamon, 1985.

HALLIWELL, B. Drug antioxidant effects. A basis for drug selection? **Drugs**, v. 42, n. 4, p. 569-605, 1991.

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v. 11, n. 1, p. 73-88, 1990.

HAYFLICK, L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. **Experimental Cell Research**, v. 37, n. 3, p. 614-636, 1965.

HENKEL, R.; BITTNER, J.; WEBER, R.; HÜTHER, F.; MISKA, W. Relevance of zinc in human sperm flagella and its relation to motility. **Fertility Sterility**, v. 71, n. 6, p. 1138-1143, 1999.

HIPKISS, A. R. Glycation, ageing and carnosine: are carnivorous diets beneficial? **Mechanisms Ageing Development**, v. 126, n. 10, p. 1034-1039, 2005.

HIPKISS, A. R.; PRESTON, J. E.; HIMSWORTH, D. T. M.; WORTHINGTON, V. C.; ABBOT, N. J. Protective effects of carnosine against malondialdehyde-induced toxicity towards cultured rat brain endothelial cells. **Neuroscience Letters**, v. 238, n. 3, p. 135-138, 1997.

HIPKISS, A. R.; WORTHINGTON, V. C.; HIMSWORTH, D. T. J.; HERWIG, W. Protective effects of carnosine against protein modification mediated by malondialdehyde and hypochlorite. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1380, n. 1, p. 46-54, 1998.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1, p. 3-22, 2000.

HOLT, W. V.; NORTH, R. D. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 51, n. 3, p. 414-424, 1994.

HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. **International Journal of Andrology**, v. 10, n. 6, p. 809-828, 1987.

INAGAKI, M.; KIKUCHI, M.; ORINO, K.; OHNAMI, Y.; WATANABE, K. Purification and quantification of lactoferrin in equine seminal plasma. **The Journal of Veterinary Medical Science/the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 64, n. 1, p. 75-77, 2002.

JANETT, F.; THUN, R.; NIEDERER, K.; BURGER, D.; HÄSSIG, M. Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warmblood stallion. **Theriogenology**, v. 60, n. 3, p. 453-461, 2003.

JASKO, D. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **Ars Veterinaria**, v. 10, n. 2, p. 156-165, 1994.

JOBIM, M.; SMITT, F.; OBERST, E. Perfil proteico do plasma seminal de garanhões de alta e baixa qualidade de sêmen. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 27, p. 209-211, 2003.

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

KENDALL, N. R.; MCMULLEN, S.; GREEN, A.; RODWAY, R. G. The effect of a zinc, cobalt and selenium soluble glass bolus on trace element status and semen quality of ram lambs. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 4, p. 277-283, 2000.

LADHA, S. Lipid heterogeneity and membrane fluidity in a highly polarized cell, the mammalian spermatozoon. **The Journal of Membrane Biology**, v. 165, n. 1, p. 1-10, 1998.

LANGLAIS, J.; ROBERTS, K. D. A molecular membrane model of sperm capacitation and the acrosome reaction of mammalian spermatozoa. **Gamete Research**, v. 12, n. 2, p. 183-224, 1985.

LARSON, K. L.; DEJONGE, C. J.; BARNES, A. M.; JOST, L. K.; EVENSON, D. P. Sperm chromatin structure assay parameters as predictors of failed pregnancy following assisted reproductive techniques. **Human Reproduction**, v. 15, n. 8, p. 1717-1722, 2000.

LIMA, R. A. S.; SHIROTA, R.; BARROS, G. S. C. **Estudo do complexo do agronegócio cavalo**. Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil - CNA, 2006. Disponível em: <www.cepea.esalq.usp.br/pdf/cavalo_completo.pdf>. Acesso em: 07 jan. 2012.

LONG, J.; LIU, C.; SUN, L.; GAO, H.; LIU, J. Neuronal mitochondrial toxicity of malondialdehyde: inhibitory effects on respiratory function and enzyme activities in rat brain mitochondria. **Neurochemical Research**, v. 34, n. 4, p. 786-794, 2009.

LOOMIS, P. Factors affecting the success of artificial insemination with cooled, transported semen. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 39., 1993, San Antonio, Texas. **Proceedings...** Santo Antonio, Texas, 1993.

LOVELL, M. A.; MARKESBERY, W. R. Oxidative DNA damage in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 22, p. 7497-7504, 2007.

MACHADO, M. S. Dinâmica folicular em éguas. In: SEMINÁRIO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 2002, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, 2002. 20 p.

MAIA, M.; BICUDO, S. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte**, v. 33, n. 4, p. 183-193, 2009.

MARNETT, L. J. Chemistry and biology of DNA damage by malondialdehyde. **International Agency for Reserach on Cancer**, v. 150, p. 17-27, 1999.

MCFARLAND, G. A.; HOLLIDAY, R. Retardation of the senescence of cultured human diploid fibroblasts by carnosine. **Experimental Cell Research**, v. 212, n. 2, p. 167-175, 1994.

MEDEIROS, A.; GOMES, G.; CARMO, M.; PAPA, F.; ALVARENGA, M. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. **Theriogenology**, v. 58, n. 2-4, p. 273-276, 2002.

MOUSTAFA, A.; MESZAROS, I. Interrelationship between the total protein content of bovine seminal plasma and behaviour of the spermatozoa after freezing and thawing. **Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae**, v. 28, n. 4, p. 403-408, 1980.

NEDELJKOVIC, Z. S.; GOKCE, N.; LOSCALZO, J. Mechanisms of oxidative stress and vascular dysfunction. **Postgraduate Medical Journal**, v. 79, n. 930, p. 195-200, 2003.

NEILD, D. M.; BROUWERS, J. F. H. M.; COLENBRANDER, B.; AGÜERO, A.; GADELLA, B. M. Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 72, n. 2, p. 230-238, 2005.

NG, T. B.; GAO, W.; LI, L.; NIU, S. M.; ZHAO, L.; LIU, J.; SHI, L. S.; FU, M.; LIU, F. Rose (*Rosa rugosa*)-flower extract increases the activities of antioxidant enzymes and their gene expression and reduces lipid peroxidation. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 83, n. 1, p. 78-85, 2005.

NICHI, M. **Efeito do tratamento com antioxidantes e ácidos graxos poli-insaturados em amostras espermáticas epididimárias de touros**. 2009. 120 p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

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, MS**. 2003. 78 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

NICHI, M.; GOOVAERTS, I. G. F.; CORTADA, C. N. M.; BARNABE, V. H.; DE CLERCQ, J. B. P.; BOLS, P. E. J. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34°C. **Theriogenology**, v. 67, n. 2, p. 334-340, 2007.

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

O'BRYAN, M. K.; MURPHY, B. F.; LIU, D. Y.; CLARKE, G. N.; BAKER, H. W. G. The use of anticlusterin monoclonal antibodies for the combined assesment of human sperm morphology and acrosome integrity. **Human Reproduction**, v. 9, n. 8, p. 1490-1496, 1994.

OLDEREID, N. B.; THOMASSEN, Y.; PURVIS, K. Selenium in human male reproductive organs. **Human Reproduction**, v. 13, n. 8, p. 2172-2176, 1998.

PAGL, R.; AURICH, C.; KANKOFER, M. Anti-oxidative status and semen quality during cooled storage in stallions. **Journal of Veterinary Medicine Series A**, v. 53, n. 9, p. 486-489, 2006.

PARKS, J. E.; HAMMERSTEDT, R. H. Development changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. **Biology of Reproduction**, v. 32, n. 3, p. 653-668, 1985.

PENG, TSUNG-I; JOU, MEI-JIE. Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 1201, p. 183-188, 2010.

PICKETT, B. The stallion: retrospective analyses and opinions. **Biology of Reproduction**, n.1, p.547-564, 1995.

POPE, C. E.; ZHANG, Y. Z.; DRESSER, B. L. A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v. 22, n. 1, p. 87-95, 1991.

RITTIÉ, L.; MONBOISSE, J.-C.; GORISSE, M.-C.; GILLERY, P. Malondialdehyde binding to proteins dramatically alters fibroblast functions. **Journal Cell Physiology**, v. 191, n. 2, p. 227-236, 2002.

RODRIGUES, M. P. **Perfil oxidativo e avaliação funcional de sêmen criopreservado de touros (*Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*) criados em clima tropical**. 2009. 144 p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, University of São Paulo, São Paulo, 2009.

RONCERO-RAMOS, I.; DELGADO-ANDRADE, C.; RUFIAN-HENARES, J. A.; CARBALLO, J.; NAVARRO, M. P. Effects of model Maillard compounds on bone characteristics and functionality. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 11, p. 2816-2821, 2013.

SAKKAS, D.; ALVAREZ, J. G. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. **Fertility Sterility**, v. 93, n. 4, p. 1027-1036, 2010.

SCHUTT, F.; BERGMANN, M.; HOLZ, F. G.; KOPITZ, J. Proteins modified by malondialdehyde, 4-hydroxynonenal, or advanced glycation end products in lipofuscin of human retinal pigment epithelium. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 44, n. 8, p. 3663-3668, 2003.

SHAO, L.; LI, Q. H.; TAN, Z. L-carnosine reduces telomere damage and shortening rate in cultured normal fibroblasts. **Biochemical Biophys Research Communications**, v. 324, n. 2, p. 931-936, 2004.

SMITH, M. A.; TANEDA, S.; RICHEY, P. L.; MIYATA, S.; YAN, S. D.; STERN, D.; SAYRE, L. M.; MONNIER, V. M.; PERRY, G. Advanced maillard reaction end-products are associated with alzheimer-disease pathology. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 5, p. 1794-1794, 1995.

SMITH, Y.; WICHMANN, T.; FACTOR, S. A.; DELONG, M. R. Parkinson's disease therapeutics: new developments and challenges since the introduction of levodopa. **Neuropsychopharmacology**, v. 37, n. 1, p. 213-246, 2012.

STITT, A. W. The maillard reaction in eye diseases. **Maillard Reaction: Chemistry At The Interface Of Nutrition, Aging, And Disease**, v. 1043, p. 582-597, 2005.

TEZEL, G.; LUO, C.; YANG, X. J. Accelerated aging in glaucoma: immunohistochemical assessment of advanced glycation end products in the human retina and optic nerve head. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 48, n. 3, p. 1201-1211, 2007.

THOMSON, L. K.; FLEMING, S. D.; AITKEN, R. J.; DE IULIIS, G. N.; ZIESCHANG, J.-A.; CLARK, A. M. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. **Human Reproduction**, v. 24, n. 9, p. 2061-2070, 2009.

THORPE, S. R.; BAYNES, J. W. Role of the maillard reaction in diabetes mellitus and diseases of aging. **Drugs & Aging**, v. 9, n. 2, p. 69-77, 1996.

TROEDSSON, M.; LEE, C.; FRANKLIN, R.; CRABO, B. The role of seminal plasma in post-breeding uterine inflammation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 56, p. 341-349, 1999. Suppl.

UTTARA, B.; SINGH, A. V.; ZAMBONI, P.; MAHAJAN, R. T. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. **Current Neuropharmacology**, v. 7, n. 1, p. 65-74, 2009.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VERNET, P.; AITKEN, R. J.; DREVET, J. R. Antioxidant strategies in the epididymis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 216, n. 1-2, p. 31-39, 2004.

WATSON, P. F. The roles of lipid and protein in the protection of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 62, n. 2, p. 483-492, 1981.

ZAHN, S. F. **Avaliação dos constituintes bioquímicos e protéicos do plasma seminal e do soro sanguíneo e das proteínas de membrana espermática e sua correlação com a qualidade do sêmen congelado em garanhões**. 2006. 116 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2006.