FERNANDA JORDÃO AFFONSO

Efeito do uso dos antioxidantes melatonina, ácido ferúlico e mioinositol sobre a motilidade, integridade de membranas e produção de espécies reativas de oxigênio em sêmen equino refrigerado

São Paulo

2013

FERNANDA JORDÃO AFFONSO

Efeito do uso dos antioxidantes melatonina, ácido ferúlico e mioinositol sobre a motilidade, integridade de membranas e produção de espécies reativas de oxigênio em sêmen equino refrigerado

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

Departamento:
Reprodução Animal

Área de concentração:
Reprodução Animal

Orientador:
Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda.

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2013

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2837
FMVZ

Affonso, Fernanda Jordão

Efeito do uso dos antioxidantes melatonina, ácido ferúlico e mioinositol sobre a motilidade, integridade de membranas e produção de espécies reativas de oxigênio em sêmen equino refrigerado / Fernanda Jordão Affonso. -- 2013.
78 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda.

1. Sondas fluorescentes. 2. DCFH-DA. 3. Fluorímetro. 4. JC-1. 5. PI. 6. FITC-PSA. 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 "Efeito do uso de aditivos durante o processo de refrigeração na motilidade, integridade das membranas e produção de espécies reativas de oxigênio no sêmen equino", protocolado sob o nº 2970/2013, utilizando 4 (quatro) cavalos, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda, 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 "Effects of additives use on the cooling process use of on motility, membranes integrity and oxygen reactive species production on equine semen", protocol number 2970/2013, utilizing 4 (four) horses, under the responsibility Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda, 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

Nome: AFFONSO, Fernanda Jordão.

Título: Efeito do uso dos antioxidantes melatonina, ácido ferúlico e mioinositol sobre a motilidade, integridade de membranas e produção de espécies reativas de oxigênio em sêmen equino refrigerado

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: _____

À minha mãe (Regina) e à minha irmã (Fabiana).

*Muito obrigada por serem as duas outras partes
do tripé. Sem vocês não teria como, nem porquê.*

Com todo meu amor, dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda, pela oportunidade concedida, por ter me apresentado à vida acadêmica e por me permitir adquirir conhecimentos que serão levados para a vida toda. Meus mais sinceros agradecimentos.

À minha família, em especial meu avô (Fernando), minha avó (Yara) e a San, pelo apoio, pelo interesse e cumplicidade. Muito obrigada.

À Guta (Dra Maria Augusto Alonso) por ter sido a primeira pessoa a acreditar em mim, quando nem eu mesmo acreditava. Minha eterna gratidão.

À equipe do experimento: Henrique, Kleber, Renata e Ticiano pela força de vontade, sem vocês não seria possível. Muito obrigada.

Aos pós graduandos do VRA, em especial aos meus amigos, por terem feito os meus dias mais felizes (não vou citar nomes pra não esquecer de ninguém). Muito obrigada pela companhia.

À Prof. Dra Eneiva Carla Celeghini, por estar sempre pronta para ajudar. Muito obrigada pelas dicas e conselhos.

Ao Fer, pela cumplicidade, por ter se tornado meu grande amigo e acima de tudo meu “compañero”.

Ao Fernando, por ter se dedicado ao meu equilíbrio por tanto tempo e por ter feito os meus dias muito melhores. Muito obrigada, de coração.

Ao Prof. Paulo Henrique Mazza, por ter feito o verdadeiro milagre de me fazer entender estatística.

Aos meus eternos amigos da 72. Vocês vivem no meu coração.

E por último, mas não menos importante, aos cavalos Denver, Grafite, Narai e Vadinho, por existirem, colaborarem e tornarem possível esse trabalho. Muito obrigada.

RESUMO

AFFONSO, F. J. Efeito do uso dos antioxidantes melatonina, ácido ferúlico e mioinositol sobre a motilidade, integridade de membranas e produção de espécies reativas de oxigênio em sêmen equino refrigerado. [Effect of the use of the antioxidants melatonin, ferulic acid and myoinositol on motility, membrane integrity and oxygen reactive species production in cooled equine semen]. 2013. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O estresse oxidativo é prejudicial a diversas características espermáticas, como motilidade e integridade das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial, podendo levar a redução da fertilidade, inclusive no sêmen refrigerado. Poucos estudos foram realizados utilizando-se a melatonina com o intuito de melhorar as características espermáticas em equinos. O mioinositol e o ácido ferúlico, por sua vez, nunca foram utilizados nessa espécie. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência desses compostos nas características do sêmen equino refrigerado. Para isso, foram utilizadas quatro ejaculados, de quatro animais conhecidamente férteis, com idade entre 4 e 8 anos. Após a coleta, o sêmen foi distribuído entre os quatro tratamentos, sendo eles, melatonina, ácido ferúlico, mioinositol e controle, utilizando-se diluidor à base de leite desnatado, na concentração de 25 milhões de espermatozoides por mL. As amostras foram refrigeradas à 5°C, sob uma curva de refrigeração de 0,09°C/min e avaliadas com 0, 4 e 8 horas de refrigeração, quanto às características de motilidade (CASA), integridade das membranas plasmática, acrossomal e o potencial de membrana mitocondrial (utilizando-se as sondas fluorescentes PI, H342, FITC-PSA e JC-1, por microscopia de epifluorescência), e quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio (utilizando-se a sonda fluorescente DCFH-DA, por fluorimetria). Os dados obtidos foram analisados pelo programa SAS, versão 9.3 (SAS, 2011). As características de motilidade não foram afetadas pelos tratamentos, com exceção da Amplitude Lateral de Cabeça (ALH, $\mu\text{m/s}$), que foi maior nas amostras tratadas com mioinositol ($8,34 \pm 0,21$), em relação ao grupo controle ($7,87 \pm 0,20$). Foi observado efeito de interação entre tempo e tratamento para a variável Velocidade de Trajeto (VAP; $P < 0,05$). Quanto à integridade das membranas, todas as variáveis sofreram efeito dos tratamentos, com exceção da porcentagem de células com membrana plasmática intacta (MPI). A porcentagem de células com membranas íntegras (membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e alto potencial de mitocôndria; PIAIA), foi maior nos grupos tratados com melatonina ($78,07 \pm 2,02$) e com ácido ferúlico ($78,78 \pm 1,66$), em comparação ao grupo controle ($73,75 \pm 2,01$). A

porcentagem de células com alto potencial de mitocôndria (APM), também foi maior nos grupos tratados com melatonina ($80,11 \pm 1,85$) e com ácido ferúlico ($81,01 \pm 1,50$), em relação ao grupo controle ($76,56 \pm 1,99$). Já a porcentagem de membrana acrossomal intacta (MAI), foi maior no grupo tratado com melatonina ($99,69 \pm 0,07$), em relação a todos os outros grupos ($99,41 \pm 0,09$; $99,33 \pm 0,09$; $99,39 \pm 0,09$; mioinositol, ácido ferúlico e controle, respectivamente). A fluorescência emitida, relativa à quantidade de espécies reativas de oxigênio presentes na amostra não foi alterada pelos tratamentos, em nenhum dos tempos. Com isso conclui-se que a adição de melatonina e ácido ferúlico aumenta a porcentagem de células com alto potencial de mitocôndria, sugerindo a adição desses compostos ao diluidor visando maior manutenção da viabilidade por até 8 horas de refrigeração.

Palavras-chave: Sondas fluorescentes. DCFH-DA. Fluorímetro. JC-1. PI. FITC-PSA.

ABSTRACT

AFFONSO, F. J. Effect of the use of the antioxidants melatonin, ferulic acid and myoinositol on motility, membrane integrity and oxygen reactive species production in cooled equine semen. [Efeito do uso dos antioxidantes melatonina, ácido ferúlico e mioinositol sobre a motilidade, integridade de membranas e produção de espécies reativas de oxigênio em sêmen equino refrigerado]. 2013. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Oxidative stress is detrimental to several sperm characteristics such as motility, plasma, acrosomal and mitochondrial membrane integrity, and can lead to reduced fertility, also in cooled semen. Few studies were performed using melatonin intending an improvement in equine sperm characteristics. Para isso, foram utilizadas quatro ejaculados, de quatro animais conhecidamente férteis, com idade entre 4 e 8 anos. Myoinositol and ferulic acid, in turn, were never used in this species. The objective of the present study was to evaluate the influence of these compounds in equine cooled semen characteristics. Four collections from four stallions of known fertility aged between 4 and 8 years old were used. After collection, semen was distributed in one of the four treatments, melatonin, ferulic acid, myoinositol and control. A skim milk based extender was used and semen was diluted to a final concentration of 25 million sperm per mL. Samples were cooled at 5°C, at a cooling rate of 0.09°C/min and evaluated at 0, 4 and 8 hours of cooling. Characteristics analyzed were motility (CASA), plasma and acrosomal membrane integrity mitochondrial membrane potential (using fluorescent probes PI, H342, FITC-PSA e JC-1, using epifluorescence microscopy), and reactive oxygen species production quantification (using DCFH-DA fluorescent probe, by fluorimetry. Data obtained were analyzed using SAS program, 9.3 version (SAS, 2011). Motility characteristics were not affected by treatments, with the exception of average of lateral head displacement (ALH, $\mu\text{m/s}$), which was greater in myoinositol treated samples (8.34 ± 0.21), in comparison to the control group (7.87 ± 0.20). An interaction effect was detected between time and treatment for the velocity of the average path (VAP; $P < 0.05$). Regarding membrane integrity, all variables were affected by treatments, with the exception of the percentage of intact plasma membrane cells (IPM). The percentage of cells with intact membranes (intact plasma membrane, intact acrosome, high mitochondrial potential; IPIAH) was greater for the groups treated with melatonin (78.07 ± 2.02) and ferulic acid (78.78 ± 1.66), comparing to the control group (73.75 ± 2.01). The percentage of cells with high mitochondrial potential (HMP) was also greater in melatonin treated group (80.11 ± 1.85) and ferulic acid (81.01 ± 1.50) comparing to the control group (76.56 ± 1.99). Percentage of

cells with intact acrosomal membrane (IAM) was higher in melatonin treated group (99.69 ± 0.07) than all the other groups (99.41 ± 0.09 ; 99.33 ± 0.09 ; 99.39 ± 0.09 ; myoinositol, ferulic acid and control, respectively). Concerning reactive oxygen species in the sample, emitted fluorescence was not altered by treatments at any moment evaluated. It can be concluded that the addition of melatonin and ferulic acid the percentage of high mitochondrial potential cells, suggesting a beneficial utilization of these compounds in the extender for a greater maintenance of viability up to 8 hours of cooling.

Keywords: Fluorescent probe. DCFH-DA. Fluoremeter. JC-1. PI. FITC-PSA.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Médias $\pm$ erros padrão das características de motilidade, entre os tratamentos: mioinositol (MIO), ácido ferúlico (AF), melatonina (MEL) e controle (CON), avaliadas em sêmen equino refrigerado (8 horas).53
- Tabela 2 - Médias $\pm$ erros padrão da Velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), entre os tratamentos: mioinositol (MIO), ácido ferúlico (AF), melatonina (MEL) e controle (CON); avaliada em sêmen equino, nos tempos 0, 4 e 8 horas de refrigeração.54
- Tabela 3 - Médias $\pm$ erros padrão das integridades das membranas, entre os tratamentos: mioinositol (MIO), ácido ferúlico (AF), melatonina (MEL) e controle (CON), avaliadas em sêmen equino refrigerado (8 horas).55
- Tabela 4 - Médias $\pm$ erros da padrão da fluorescência emitida, relativa a quantidade de espécies reativas de oxigênio, entre os tratamentos: mioinositol (MIO), ácido ferúlico (AF), melatonina (MEL) e controle (CON), avaliada em sêmen equino refrigerado (8 horas).55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL	microlitro
μM	micromolar
μm	micrômetro
AF	ácido ferúlico
ALH	amplitude lateral de cabeça
AMPc	monofosfato cíclico de adenosina
APM	alto potencial de mitocôndria
ATP	adenosinatrifosfato
BCF	frequência de batimento flagelar
Ca^{2+}	íon cálcio
CASA	Computer Assisted Sperm Analysis (Análise Espermática Computadorizada Assistida)
C-C	carbono-carbono
CNA	Confederação Nacional de Agricultura
CON	controle
Cl^-	íon cloreto
Cu^{2+}	íon cúprico
DAF-2/DA	diaminofluoresceína diacetato
DAG	diacilglicerol
DCFH-DA	2',7'-diacetato de diclorofluoresceína
DNA	ácido desoxirribonucleico
EGCG	epigallocatequina-3-galato
ERs	espécies reativas
EROs	espécies reativas de oxigênio
ERNs	espécies reativas de nitrogênio
Fe^{2+}	íon ferroso
FITC	isotiocianato de fluoresceína
GMPc	guanosina monofosfato cíclico
H^+	íon hidrogênio
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
H33342	Hoechst 33342
HIOMT	hidroxiindol - O - metil transferase

hidro	hidrossolúvel
hipo	hiposmótico
HOCl	ácido hipocloroso
Hz	Hertz
InsP3	inositol trifosfato
JC-1	iodeto de 5,5',6,6'-tetracoloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolilcarbocianina
LIN	linearidade
MAI	membrana acrossomal íntegra
MEL	melatonina
mg	miligrama
min	minuto
MIO	mioinositol
MPI	membrana plasmática íntegra
mL	mililitro
mM	milimolar
MP	motilidade progressiva
MT	motilidade total
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NAT	N -acetil transferase
nm	nanômetro
NO•	óxido nítrico
O ₂ • ⁻	ânio superóxido
OH•	radical hidroxila
ONOO ⁻	peroxinitrito
P	nível de significância
pg	picogramas
PI	iodeto de propídio
PIAIA	membrana plasmática intacta, acrossoma intacto e alto potencial mitocondrial
PROC	procedure (procedimento)
PSA	aglutinina de Pisum sativum
R	coeficiente de correlação
REDOX	reação de redução-oxidação
RNA	ácido ribonucleico

s	segundo
SAS	Statistical Analysis System (Sistema de Análise Estatística)
STR	retilinearidade
T0	tempo 0 hora de refrigeração
T4	tempo 4 horas de refrigeração
T8	tempo 8 horas de refrigeração
UFR	unidade de fluorescência relativa
VAP	velocidade do trajeto
VCL	velocidade curvilinear
VSL	velocidade progressiva

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
/	por
°C	graus Celsius
:	para (2:2)
<	menor que
-	menos
=	igual
®	marca registrada
±	mais ou menos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	SÊMEN REFRIGERADO	21
2.2	ESPÉCIES REATIVAS E ANTIOXIDANTES	23
2.3	MELATONINA	28
2.4	ÁCIDO FERÚLICO	32
2.5	MIOINOSITOL	34
2.6	MÉTODOS DE ANÁLISE DO SÊMEN EQUINO	37
2.6.1	Cinética espermática	38
2.6.2	Integridade das membranas plasmática, acrossomal e função mitocondrial	39
2.6.3	Mensuração da produção de espécies reativas de oxigênio	41
3	CAPÍTULO 1 - EFEITO DO USO DOS ANTIOXIDANTES MELATONINA, ÁCIDO FERÚLICO E MIOINOSITOL SOBRE AS CARACTERÍSTICAS DE MOTILIDADE, INTEGRIDADE DE MEMBRANAS E PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM SÊMEN EQUINO REFRIGERADO.	43
3.1	INTRODUÇÃO	47
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.2.1	Animais e coleta	49
3.2.2	Preparação das amostras	50
3.2.3	Refrigeração	50
3.2.4	Análises	51
3.2.4.1	<i>Análise de motilidade</i>	51
3.2.4.2	<i>Análise das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial</i>	51
3.2.4.3	<i>Mensuração das espécies reativas de oxigênio</i>	52
3.2.5	Análise estatística	52
3.3	RESULTADOS	53

3.3.1 Características de motilidade	53
3.3.2 Integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial	54
3.3.3 Quantidade de espécies reativas de oxigênio.	55
3.4 DISCUSSÃO	55
3.5 CONCLUSÃO	58
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

O mercado relacionado aos equinos no Brasil, gira em torno de 7,5 bilhões de reais, gerando 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos (ALMEIDA; SILVA, 2010). Segundo a Confederação Nacional de Agricultura (CNA, 2011), em pesquisa realizada no ano de 2011, o efetivo de equinos no país contava com 5,5 milhões de cabeças, estando cerca de 50% do plantel concentrado no Sudeste (24,4%) e no Nordeste (24,3%) do país.

Com o advento das biotécnicas aplicadas à reprodução, entre elas a utilização do sêmen refrigerado e criopreservado, juntamente com a liberação da utilização delas por praticamente todas as associações de raças, a tendência para o futuro é o aumento do plantel tanto no que diz respeito à quantidade, mas principalmente, à qualidade dos animais.

O Brasil é o segundo país que mais utiliza sêmen refrigerado transportado (PAPA et al. 2005), perdendo apenas para os Estados Unidos (CANISSO et al., 2008). Fato de extrema importância, uma vez que o uso do sêmen transportado permite a cobertura com garanhões que não estejam na mesma propriedade que as éguas, eliminando a necessidade de transporte das éguas e muitas vezes, seus potros, entre os haras, maximizando o uso de garanhões geneticamente valiosos (NUNES et al., 2008).

O transporte de sêmen propicia também o melhor aproveitamento do animal. Isso porque um garanhão ejacula em torno de 100 a 200 milhões de espermatozoides/mL (DOWSETT; KNOTT, 1996) e um volume de 30 a 100 mL da fração livre de gel (SIEME, 2009) e para a inseminação com sêmen refrigerado, é preconizada a utilização de 1 bilhão de espermatozoides com motilidade (BEDFORD-GUAUS, 2007). Sendo assim, é possível fracionar o ejaculado total em diversas doses inseminantes, facilitando o melhoramento genético.

Apesar do progresso considerável que o armazenamento de sêmen equino refrigerado vem passando ao longo dos últimos anos, ainda persiste uma grande diferença de qualidade entre indivíduos (BALL, 2008).

Um dos fatores que podem aumentar a vulnerabilidade dos espermatozoides durante o armazenamento do sêmen é a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), responsáveis por danos na membrana plasmática, contribuindo para perda da motilidade e/ou capacidade fertilizante (AURICH, 2005).

Desde a década de 50, pesquisadores falam sobre a vulnerabilidade do espermatozoide às EROs, devido à alta quantidade de ácidos graxos polinsaturados nos lipídeos das membranas plasmáticas e a falta de sistemas endógenos de proteção (MANN, 1954).

Segundo Aitken e colaboradores (2012), um dos avanços mais importantes nos últimos anos vem sendo a descoberta que um dos maiores causadores dos danos de função espermática é o estresse oxidativo.

No entanto, vale ressaltar que as EROs são intermediárias químicas oriundas do metabolismo normal do oxigênio (MAIA; BICUDO, 2009) e que níveis fisiológicos são requeridos para as funções espermáticas normais como hiperativação, capacitação e reação acrossomal (IULIIS et al., 2009).

O plasma seminal é rico em antioxidantes e oferece proteção ao espermatozoide. Baseando-se nisso, diversos estudos têm demonstrado que a adição de antioxidantes aos meios de refrigeração ajuda a proteger o espermatozoide contra o dano induzido pelos radicais livres, em diversas espécies animais (MAIA; BICUDO, 2009).

Apesar de vários antioxidantes já terem sido utilizados com esse fim, a melatonina, o mioinositol e o ácido ferúlico são compostos nunca antes estudados no sêmen equino, ou poucas vezes, no caso da melatonina.

A melatonina é o principal hormônio produzido e secretado pela glândula pineal (CLAUSTRAT; BRUN; CHAZOT, 2005). Participa de diversas funções fisiológicas, e segundo grande conjunto de evidências é o maior removedor de moléculas reativas tanto à base de oxigênio quanto nitrogênio (CARPENTIERI et al., 2012; ASHRAFI; KOHRAM; ARDABILI, 2013).

O inositol é um hexahidroxíciclohexano que pode ser arranjado em nove estereoisômeros, sendo que o mais importante na natureza é o mioinositol (BEEMSTER; GROENEN; STEEGERS-THEUNISSEN, 2002; ALMEIDA et al., 2003). Alguns autores evidenciaram a atividade antioxidante do inositol e seus derivados, preferencialmente atingindo a mitocôndria e principalmente contra ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila, em sêmen humano (COLONE et al., 2010; CONDORELLI et al., 2011).

O ácido ferúlico, um composto fenólico, componente orgânico da parede celular de plantas, exibe uma ampla gama de efeitos terapêuticos contra diversas doenças, incluindo câncer, diabetes, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares. A função biológica específica do ácido ferúlico é a sua atividade antioxidante, isto é sua habilidade em eliminar formas reativas do oxigênio e radicais livres, e essa propriedade vem sendo confirmada por diversos

estudos, inclusive em sêmen humano (ITAGAKI et al., 2009; LANZAFAME et al., 2009; KOH, 2012; URBANIAK; SZELA; MOLSKI, 2013).

Sendo assim, o presente estudo visa testar a adição de melatonina, ácido ferúlico e mioinositol ao diluidor utilizado no processo de refrigeração, visando diminuição da produção de espécies reativas (ERs) e consequente estresse oxidativo, com o objetivo de melhorar a qualidade do sêmen refrigerado por até 8 horas, permitindo assim, que sua ampla utilização se torne cada vez mais eficiente e atinja os resultados esperados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SÊMEN REFRIGERADO

A refrigeração e transporte do sêmen de garanhões para posterior inseminação artificial são práticas rotineiras na criação de equinos (ARRUDA et al., 2009). A refrigeração diminui a atividade metabólica dos espermatozoides, reduz o crescimento microbiano e subsequentemente, mantem a viabilidade do sêmen por maiores períodos de tempo (KATILA, 1997).

Apesar da fertilidade do sêmen equino refrigerado a 5°C ser similar a do sêmen *in natura*, existe a hipótese de que as taxas de prenhez subótimas obtidas na inseminação artificial em equinos, podem ser principalmente, resultado da utilização de sêmen de baixa qualidade, não processado adequadamente para o transporte (AURICH, 2005; HECKENBICHLER et al., 2011).

Por isso, um melhor conhecimento desse processo é necessário, visando melhorar a eficiência tanto no laboratório, quanto em condições a campo. Temperatura e tempo de armazenamento, equipamento utilizado para o transporte, curva de refrigeração, qualidade do diluidor, dose inseminante, número de inseminações por ciclo e intervalo entre a inseminação e a ovulação são fatores que afetam a capacidade fertilizante do sêmen equino refrigerado (NUNES et al., 2008; VIDAMENT et al., 2012).

O passo mais crítico para o espermatozoide é a própria refrigeração até a temperatura de armazenamento. A passagem da temperatura de 37 para 8°C pode resultar em um dano específico na membrana plasmática, principalmente caracterizado por padrões anormais de movimentação, rápida perda de motilidade durante o armazenamento, dano na membrana acrossomal, assim como redução no metabolismo devido à perda de enzimas e outros componentes intracelulares (AMANN; PICKETT, 1987; MORAN et al., 1992).

Sendo assim, o sêmen deve ser refrigerado lentamente até uma temperatura entre 4 e 6°C. Essa é considerada a faixa ideal de temperatura para o armazenamento, visando manter tanto a motilidade quanto a fertilidade (VARNER et al., 1987). Em temperaturas mais altas, condições aeróbicas de armazenamento são requeridas e o crescimento bacteriano é facilitado (AURICH, 2008).

Portanto, devem ser utilizados dispositivos que promovam uma curva de refrigeração confiável, sendo de no mínimo -0,3°C/min inicialmente (KATILA, 1997) e então mais lenta (-

0,07°C/min) durante as temperaturas de transição da fase lipídica da membrana (19-8°C), consideradas críticas para o espermatozoide equino (BEDFORD-GUAUS, 2007).

O primeiro sistema comercial de refrigeração de sêmen equino foi o Equitainer® (DOUGLAS-HAMILTON et al., 1984). Desde então, segundo Silva Filho et al. (1998) podem ser identificadas as metodologias japonesa, holandesa, americana, francesa, alemã e brasileira, a qual inclui formas mais econômicas e igualmente eficientes de transporte de sêmen para as condições tropicais. Esses *containers* são dispositivos de transporte, que possuem um sistema de refrigeração passiva, promovendo variáveis taxas de refrigeração (BRINSKO et al., 1999). Além da curva de refrigeração, a ótima manutenção da motilidade a 5°C depende também de adequada diluição do plasma seminal, com diluidor apropriado (LOOMIS, 2006). Os diluidores mais comumente utilizados para transporte do sêmen equino refrigerado são à base de leite desnatado, ou gema de ovo (KENNEY et al., 1975; AURICH, 2008). Atualmente já é bem estabelecido que o sêmen para transporte deve ser diluído em uma concentração final de 25-50 milhões de espermatozoides por mL, com uma taxa de diluição extensor-sêmen de não menos que 2:1 (volume:volume) (BEDFORD-GUAUS, 2007).

Os métodos de processamento do sêmen devem ser ajustados à sensibilidade dos espermatozoides, a fim de evitar o máximo de danos possível. Isso porque o espermatozoide maduro perdeu a maioria das suas organelas celulares e não mais ocorre a transcrição do DNA, de modo que, os mecanismos de reparação não estão disponíveis e o dano à membrana plasmática espermática resulta em perda irreversível de função (AURICH, 2005).

O desenvolvimento de meios extensores e meios de processamento do sêmen vem resultando na melhora na qualidade durante o armazenamento, no entanto, a longevidade do espermatozoide equino ainda é limitada quando comparada a suínos e ruminantes (AURICH, 2005).

Resultados de pesquisas têm sugerido que a diminuição na qualidade do espermatozoide equino após o armazenamento a 5°C pode ser devido ao dano oxidativo causado por um aumento na geração de EROs na refrigeração (ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2011). A perda da motilidade e da habilidade fertilizante pode pelo menos em parte, ser atribuída aos processos de peroxidação lipídica da membrana plasmática (AURICH, 2005).

Pensando nisso, esforços para melhorar a preservação do sêmen equino refrigerado têm focado na alteração dos diluidores, assim como na adição de componentes específicos visando manter a integridade da membrana, prevenir o estresse oxidativo ou preservar a motilidade espermática. O resultado de tais estudos tem tido variado sucesso em termos de melhora ou

até manutenção da motilidade ou (com menor frequência), da fertilidade do espermatozoide equino refrigerado (BALL et al., 2001).

2.2 ESPÉCIES REATIVAS E ANTIOXIDANTES

As EROs e as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) estão presentes em todos os organismos que vivem em ambiente aeróbico (AZIZ et al., 2010). São geradas como um produto do metabolismo oxidativo, em consequência do desvio de elétrons das atividades redutoras intracelulares, como a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (BALL; VO; BAUMBER, 2001; AITKEN e BAKER, 2004).

A origem das ERs presentes no sêmen inclui os próprios espermatozoides e os leucócitos contaminantes. Os leucócitos são facilmente encontrados em sêmen humano e possuem um potencial de geração de ERs 100 vezes maior do que os espermatozoides (FORD; WHITTINGTON; WILLIAMS, 1997), no entanto, não são comumente visualizados em garantões, em condições normais (BAUMBER et al., 2002).

Ao se tratar de ERs, o termo radical livre não é o mais adequado, pois nem toda ER é um radical livre, já que os radicais livres são moléculas que possuem um elétron não pareado, reativo e instável, o qual, para alcançar a estabilidade, tende a se ligar a outro elétron (REITER, 2000), característica que aumenta consideravelmente a sua reatividade (ANDRADE et al., 2010).

Entre os radicais livres se incluem o hidroxila ($\text{OH}\cdot$), o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), e o óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) e entre os oxidantes não radicais estão o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ácido hipocloroso (HOCl), e o peroxinitrito (ONOO^- ; AZIZ et al., 2010).

O ânion superóxido parece ser a ER mais produzida pelo espermatozoide. Pode ser produzido por uma oxidase de membrana associada à NADPH, ou como resultado do desvio de elétrons da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial (BURNAUGH; SABEUR; BALL, 2006). Por não atravessar membranas, é considerado relativamente inerte (AITKEN, 1995). No entanto, de maneira espontânea ou a partir de uma reação catalisada pela enzima superóxido dismutase, sofre reação de dismutação, originando peróxido de hidrogênio. Em baixas concentrações, tanto o ânion superóxido quanto o peróxido de hidrogênio parecem ser importantes na sinalização celular de eventos relacionados à função espermática (BURNAUGH; SABEUR; BALL, 2006).

O peróxido de hidrogênio é a ER mais associada com efeitos citopáticos no espermatozoide equino (BAUMBER et al., 2000). É considerado mais tóxico que o ânion superóxido, por ser mais estável e atravessar prontamente as membranas plasmáticas (BALL; VO; BAUMBER, 2001). Também é extremamente deletério, porque participa como intermediário na Reação de Fenton, uma reação catalisada por íons metais (Fe^{2+} ou Cu^{2+}) disponíveis no plasma seminal, que culmina na produção do radical hidroxila, altamente prejudicial por ser um potente iniciador da peroxidação lipídica (AITKEN, 1995; NORDBERG; ARNÉR, 2001).

O ácido hipocloroso é um outro metabólito reativo do oxigênio, que pode ser gerado por espermatozoides, a partir da oxidação do íon cloreto (Cl^-) pelo peróxido de hidrogênio (AITKEN, 1995).

O peroxinitrito, por sua vez, faz parte das chamadas ERNs, que trata-se de um grupo formado a partir do óxido nítrico, que é uma molécula vital e onipresente celularmente e com numerosos papéis em processos fisiológicos (KIRSCHVINK; MOFFARTS; LEKEUX, 2008; KORKMAZ et al., 2009). O peroxinitrito é inevitavelmente formado a partir da reação do óxido nítrico com o oxigênio. É altamente citotóxico, possuindo efeitos tóxicos diretos, como a peroxidação lipídica, a oxidação de proteínas e o dano no DNA (NORDBERG; ARNÉR, 2001; KORKMAZ et al., 2009).

O desbalanço entre a produção dessas moléculas e a habilidade do sistema biológico de prontamente eliminar os intermediários reativos, ou facilmente reparar os danos é conhecido como estresse oxidativo (DU PLESSIS; HAGENAAR; LAMPIAO, 2010). Este pode ser relatado como um aumento na produção de ERs, uma diminuição na capacidade antioxidante, ou uma combinação de ambos (MINERVINI et al., 2010).

O estresse oxidativo vem sendo associado com o declínio da motilidade espermática, sendo a peroxidação lipídica um dos mecanismos frequentemente citados para explicar isso (AITKEN; CLARKSON; FISHEL, 1989; AITKEN e BAKER, 2004).

O processo de peroxidação lipídica inicia-se na presença de ERs, que ao terem contato com os ácidos graxos polinsaturados da membrana espermática, que são principalmente ácidos decosaheptaenóicos, retiram um hidrogênio (H^+) de uma dupla ligação, transformando-o em radical livre, que por sua vez, irá agir em outro ácido decosaheptaenóico (RAPHAEL, 2007). Espermatozoides são frequentemente suscetíveis a esse processo, pois possuem alta concentração desses ácidos graxos na sua membrana plasmática (ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2011). Os ácidos graxos são requisitados para que a membrana possua a fluidez necessária à motilidade espermática e participação nos eventos de fusão de membrana, associados à

fertilização, assim como a integridade estrutural necessária à viabilidade (RAO; GANGADHARAN, 2008).

Assim, a cascata de peroxidação lipídica torna-se o maior contribuidor para uma função espermática defeituosa (AITKEN et al., 2012), pois tem como consequência a perda da fluidez e da integridade da membrana plasmática, o que pode levar a um aumento na permeabilidade e uma perda na capacidade de regular as concentrações intracelulares de íons envolvidos no controle do movimento espermático (BAUMBER et al., 2000).

A região celular mais afetada pela peroxidação lipídica é a peça intermediária, isso porque a maior fonte de ERs no espermatozoide é a mitocôndria (SILVA et al., 2011). Essa informação foi demonstrada por estudos com microscopia a *laser* confocal em espermatozoides bovinos, suínos e equinos, que demonstraram que além da peça intermediária, a peroxidação lipídica ocorre em menor proporção na parte posterior da cauda e é praticamente ausente na cabeça do espermatozoide (BROUWERS; GADELLA, 2003).

Além da peroxidação lipídica, a motilidade espermática pode também ser influenciada negativamente pelas alterações na função mitocondrial, causadas pelas ERs (BALL, 2000). O espermatozoide equino, por ser dependente da fosforilação oxidativa para produção de ATP, é particularmente suscetível à mudanças na função mitocondrial, e portanto, a perda de potencial de membrana tem como consequência o declínio da motilidade espermática (AITKEN et al., 2012).

O dano oxidativo parece ter influência negativa também sobre a cromatina (BURNAUGH; SABEUR; BALL, 2006), ou seja, DNA e proteínas; sobre o sistema de defesa enzimático (GRIVEAU et al., 1995) e sobre a membrana acrossomal (MARQUES et al., 2002), além da cascata de respostas biológicas precipitada pelo influxo de cálcio, incluindo exocitose acrossomal e fusão espermatozoide-oócito (AITKEN e BAKER, 2004). Essas alterações causadas pelas ERs levam à redução da função, tornando a célula espermática incapaz de fertilizar o oócito, ou produzir uma prenhez viável (RAO; GANGADHARAN, 2008; DU PLESSIS; HAGENAAR; LAMPIAO, 2010). Nesse contexto, um dos avanços mais importantes nos últimos anos é a descoberta de que um dos maiores causadores de defeitos nas funções espermáticas é o estresse oxidativo (AITKEN et al., 2012).

Com o objetivo de proteger-se do efeito letal da formação excessiva de ERs, a célula possui um sistema de defesa antioxidante enzimático e não enzimático que pode atuar tanto removendo o agente antes que ele cause lesão, quanto reparando a lesão ocorrida (MAIA; BICUDO, 2009).

Devido à limitada capacidade biosintética do espermatozoide e à baixa concentração de enzimas removedoras de ERs no citoplasma, quando existe um aumento na produção de ERs, o sistema celular se torna incapaz de neutralizá-las (AITKEN, 1995; ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2011).

Por isso, assim como as células, o plasma seminal também contém “limpadores” de ERs e eles são particularmente importantes na proteção do espermatozoide contra os danos causados por elas, sendo o plasma seminal a maior fonte de enzimas antioxidantes para os espermatozoides de mamíferos (MACÍAS-GARCÍA et al., 2012; ASHRAFI; KOHRAM; ARDABILI, 2013).

Existem três maiores sistemas enzimáticos: o sistema glutationala peroxidase/reductase, o superóxido dismutase e catalase. Além desses sistemas, muitos outros componentes do plasma seminal podem atuar como antioxidantes, entre eles as vitaminas C e E, o urato, a albumina, os aminoácidos taurina e hipotaurina, entre outros (BAUMBER et al., 2000).

A enzima antioxidante superóxido dismutase acelera a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio, enquanto as enzimas catalase e glutationala peroxidase convertem superóxido e peróxido em água e oxigênio. Catalase e superóxido dismutase eliminam o ânion superóxido produzido pela enzima NADPH oxidase (RAO; GANGADHARAN, 2008; MAIA; BICUDO, 2009; ASHRAFI; KOHRAM; ARDABILI, 2013).

Glutationala e suas enzimas relacionadas, glutationala peroxidase e reductase são o principal sistema antioxidante mitocondrial (MARTÍN et al., 2000). Glutationala peroxidase, uma enzima antioxidante contendo selênio, exclui radicais peroxila de vários peróxidos, incluindo o peróxido de hidrogênio (IRVINE, 1996). A glutationala reductase, por sua vez, regenera a glutationala oxidada, para a sua forma reduzida (RAO; GANGADHARAN, 2008).

A mitocôndria, por não conter catalase, é muito, se não inteiramente, dependente da glutationala e suas enzimas. A organela não sintetiza glutationala, mas obtém do citosol através de um sistema de transporte multicomponente, o que explica a habilidade notável da mitocôndria em capturar e reter a glutationala. Quando os níveis de enzima estão muito diminuídos, o peróxido de hidrogênio é acumulado e isso leva a um extensivo dano mitocondrial (MARTÍN et al., 2000).

Uma redução na atividade da superóxido dismutase causa um aumento no nível do ânion superóxido, o que inativa a catalase. Da mesma forma, se a catalase ou a glutationala peroxidase falham em eliminar o peróxido de hidrogênio, este se acumula causando inativação na superóxido dismutase (RAO; GANGADHARAN, 2008).

O sêmen equino é rico em catalase, que é produzido primariamente na glândula prostática. Esse alto nível parece ser mais que adequado para catabolizar o peróxido de hidrogênio produzido pelo espermatozoide no sêmen *in natura*. No entanto, existe uma marcada variação entre garanhões na atividade da catalase presente no sêmen e garanhões com atividade mais baixa podem ser mais suscetíveis ao estresse oxidativo durante o armazenamento (BALL et al., 2001).

Procedimentos que requerem diluição ou remoção do plasma seminal podem reduzir ou impedir a capacidade “limpadora” de ERs do sêmen equino. De modo que, durante o armazenamento, mesmo em condições hipotérmicas, o estresse oxidativo altera a qualidade e função espermática, sendo também um fator associado com a diminuição da fertilidade (BALL et al., 2001).

Raphael, em 2007, mostrou um aumento da peroxidação lipídica em espermatozoide equino nas primeiras 24 horas de refrigeração a 5°C, tanto no sêmen centrifugado como no sem centrifugação, mostrando que durante a manipulação, o sistema antioxidante endógeno pode não ser suficiente na prevenção da ocorrência do estresse oxidativo. De modo que, se o estresse oxidativo é uma causa tão importante da infertilidade, então existe toda possibilidade de que os antioxidantes sejam parte da cura (GHARAGOZLOO; AITKEN, 2011).

Uma grande diversidade de enzimas limpadoras e antioxidantes vem sendo utilizadas visando bloquear ou prevenir o estresse oxidativo em vários sistemas celulares. Esses antioxidantes atuam em uma variedade de passos para tanto remover ERs diretamente, quanto prevenir a propagação da peroxidação lipídica em membranas celulares (BALL et al., 2001).

Nos últimos anos, a utilização de vários antioxidantes e suas associações nos diluidores vem mostrando efeitos benéficos. Como exemplo, podemos citar vitamina E, superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e cisteína, em carneiros (BUCAK; ATESSAHIN; YÜCE, 2008; LA FALCI et al., 2011); superóxido dismutase, piruvato de sódio com catalase, EGCG (epigallocatequina-3-galato, um polifenol que exibe atividade antioxidante), Trolox (um análogo hidrossolúvel da vitamina E) e hipotaurina, em suínos (PEÑA et al., 2003; FUNAHASHI; SANO, 2005; VALLORANI et al., 2010); metionina, inositol, carnitina, cisteína e glutathione em bovinos (BUCAK et al., 2010; TUNCER et al., 2010); ascorbato e catalase em humanos (LI et al., 2010), entre muitos outros.

Aurich et al. (1997), trabalhando com sêmen de garanhão diluído em meio à base de leite desnatado ou glicina, refrigerado a 5°C, avaliaram o efeito da catalase e do ácido ascórbico na motilidade e na integridade de membrana dos espermatozoides. Observaram que a adição de ácido ascórbico resultou em um aumento na porcentagem de espermatozoides

com membrana plasmática íntegra, nos dois diluidores, porém não influenciou na motilidade. Já a catalase não exerceu influência em nenhuma das duas características, para os dois diluidores.

Também trabalhando com sêmen equino refrigerado a 5°C, Ball et al. (2001) avaliaram o efeito da catalase, hidroxitolueno butilado, vitamina E, vitamina C, Tempo (um composto lipofílico e hidrofílico), Trolox e albumina sérica bovina, sobre a manutenção da motilidade espermática e não observaram nenhuma melhora significativa.

Uma explicação teórica do porque de vitaminas antioxidantes não protegerem como esperado, se relaciona ao fato de que o estresse oxidativo é mais complexo do que se pensava anteriormente. Essa complexidade foi revelada pela descoberta da família do óxido nítrico e da óxido nítrico sintase. Devido à afinidade do óxido nítrico pelo radical ânion superóxido, níveis enzimáticos de antioxidantes convencionais não conseguem competir com ele pelo oxigênio, não evitando assim, a ocorrência de altos níveis de peroxinitrito. Esses achados, particularmente a descoberta do envolvimento do peroxinitrito como um importante reagente, tem expandido a teoria do estresse oxidativo em novas áreas (KORKMAZ et al., 2009).

2.3 MELATONINA

A N-acetil-5-metoxitriptamina, a melatonina, trata-se do principal hormônio produzido e secretado pela glândula pineal (CLAUSTRAT; BRUN; CHAZOT, 2005). Participa de diversas funções fisiológicas, incluindo as do sistema imune, o controle dos ritmos circadianos e o controle da reprodução em espécies sazonais (ASHRAFI; KOHRAM; ARDABILI; 2013).

Melatonina é sintetizada a partir do aminoácido triptofano captado da circulação, e transformado em serotonina, esta é convertida em melatonina por um processo de dois passos envolvendo atividades sequenciais de duas enzimas: a N-acetil transferase (NAT), que é a enzima limitante da síntese de melatonina, e a hidroxiindol- O-metil transferase (HIOMT; CLAUSTRAT; BRUN; CHAZOT, 2005). Trata-se de uma molécula altamente conservada, estando presente em praticamente todas as criaturas, desde procariontes até humanos. E sua função original, nos organismos mais primitivos é proteger contra o estresse oxidativo (TAN et al., 2007).

Classifica-se como uma indoleamina, e contém dois grupos funcionais, os resíduos O-metil e N-acetil, o que promove à molécula sua propriedade anfifílica (hidro e lipossolúvel), e a torna capaz de penetrar qualquer compartimento celular do fluido corporal (JOU et al., 2007; CARPENTIERI et al., 2012).

Quando a melatonina passa pelas membranas celulares, ela se localiza principalmente em posição superficial nas bicamadas lipídicas, próxima a cabeça polar dos fosfolípidos da membrana. Nessa posição, ela é capaz de funcionar como um “removedor” (*scavenger*) de radicais livres e também promover meios indiretos pelos quais as membranas podem resistir ao dano oxidativo, estabilizando a fluidez da membrana e preservando sua eficiência (REITER et al., 2000).

Por se localizar de maneira onipresente dentro da célula, a melatonina se torna um potente antioxidante endógeno (MARTÍN et al., 2000).

Diferente de outros antioxidantes muito lipofílicos, como a vitamina E, que são primariamente retidos na membrana plasmática, a melatonina atravessa membranas celulares, alcançando facilmente compartimentos intracelulares, particularmente a mitocôndria, o local mais relevante na geração de radicais livres (JOU et al., 2007; MARTÍN-HIDALGO et al., 2011).

Mitocôndrias são as estruturas subcelulares dos espermatozoides mais sensíveis à refrigeração e congelação (PEÑA et al., 2009). De acordo com essa evidência, parece lógico que se foque o interesse em antioxidantes com capacidade de facilmente alcançar a mitocôndria, como a melatonina (SILVA et al., 2011).

A indoleamina possui propriedades redutoras devido à presença de um anel aromático rico em elétrons, funcionando como um doador de elétrons (JOU et al., 2007). O seu potencial redutor exerce uma regulação nas atividades dos complexos I e IV da mitocôndria, o que sugere que ela pode interagir com componentes da cadeia de transporte de elétrons, aumentando o fluxo de elétrons e consequentemente, a produção de ATP (CARPENTIERI et al., 2012). Além disso, interage com as bicamadas lipídicas e estabiliza as membranas mitocondriais internas, um efeito que pode melhorar a atividade da cadeia de transporte de elétrons e assim, aumentar a motilidade espermática (MARTÍN-HIDALGO et al., 2011).

Sendo assim, é de particular interesse o possível papel da melatonina como um agente bioenergético que pode melhorar e manter a função mitocondrial (KORKMAZ et al., 2009).

Ianas, Olnescu e Badescu, em 1991 foram os primeiros a sugerir que a melatonina poderia funcionar como um antioxidante. Desde então, mais de 1500 publicações científicas tem direta ou indiretamente confirmado essas observações (TAN et al., 2007).

Segundo grande conjunto de evidências, a melatonina é o maior removedor de moléculas reativas tanto à base de oxigênio quanto nitrogênio (CARPENTIERI et al., 2012). A indoleamina elimina os produtos da decomposição de peroxinitritos, possui alta eficiência como removedor dos radicais hidroxila, peroxila, assim como do ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, ácido hipocloroso e óxido nítrico (ALLEGRA et al., 2003).

A melatonina pode ainda estimular a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase (KARBOWNIK; REITER, 2000). Ou seja, além de reduzir o número de radicais livres e ERs, também aumenta a produção de outras moléculas que protegem as células espermáticas do estresse oxidativo (ASHRAFI; KOHRAM; ARDABILI, 2013).

A indoleamina influencia a atividade das enzimas antioxidantes, pois altera sua expressão gênica, a partir do aumento nos níveis celulares de RNA mensageiro (REITER et al., 2000). Isso ocorre tanto em condições fisiológicas quanto oxidativas (RODRIGUEZ et al., 2004) e pode envolver tanto receptores de membrana quanto nucleares (CARPENTIERI et al., 2012).

Ashrafi, Kohram e Ardabili (2013) relataram aumento da atividade da catalase e da superóxido dismutase, depois da inclusão de várias concentrações de melatonina no diluidor de congelação, porém não observaram diferenças significativas na atividade da glutathione peroxidase.

Casao et al. (2010) também demonstraram uma alta correlação entre a concentração de melatonina no plasma de carneiros e a atividade das enzimas glutathione reductase, superóxido dismutase e catalase.

Claustrat, Brun e Chazot (2005) referem ainda que a melatonina além de aumentar os níveis de muitas enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, glutathione peroxidase e glutathione reductase, ainda inibe a enzima pró-oxidativa óxido nítrico sintase.

As ações de remoção de EROs e ERNs pela melatonina acarretam na produção de metabólitos. E estes por serem também potentes “limpadores”, aumentam o potencial antioxidante da melatonina. São chamados de segunda e terceira geração de metabólitos da melatonina e podem contribuir muito para a habilidade da molécula em proteger contra o dano oxidativo (RAO; GANGADHARAN, 2008).

Visto que todos os antioxidantes clássicos são também pró-oxidantes, outra vantagem da melatonina sobre eles é a ausência de ações pró oxidativas. Ou seja, por serem potentes doadores de elétrons, quando eles o fazem visando neutralizar um radical livre, passam de um estado reduzido para um oxidado, e essa forma oxidada pode oxidar outras moléculas. Além

disso, geralmente, a forma oxidada vai ser regenerada para o estado reduzido através do mecanismo conhecido como “reação redox” ou reciclagem, que ocorre às custas de outra molécula. No caso da reciclagem de vitamina C ou vitamina E, por exemplo, isso ocorre às custas de uma glutathione, o que pode ser uma desvantagem, pois em muitos casos, a glutathione é um antioxidante mais potente do que as vitaminas. A melatonina, por sua vez, sacrifica a si mesmo e não participa do ciclo redox após a remoção de radicais livres, e por isso ela é classificada por alguns autores como suicida ou antioxidante terminal (KORKMAZ et al., 2009).

Essas características exclusivas da melatonina a tornam uma molécula com potencial antioxidante maior do que outras moléculas previamente utilizadas com esse fim. Estudos relatam que a melatonina foi mais eficiente em remover ERs e radicais livres que a vitamina E (BAYDAS; CANATAN; TURKOGLU, 2002), o beta-caroteno (HSU et al., 2000), a vitamina C (GULTEKIN et al., 2001), a glutathione (TAN et al., 1993), entre outros.

Devido às suas propriedades antioxidantes, a melatonina pode ser adicionada aos diluidores visando melhorar as características seminais durante o armazenamento (MARTÍN-HIDALGO et al., 2011).

Apesar de ter sido relatada a presença da melatonina no plasma seminal de *hamsters* (FUJINOKI, 2008), carneiros (CASAO et al., 2010) e humanos (BORNMAN et al., 1989), assim como, de receptores de melatonina em espermatozoides humanos (VAN VUUREN et al., 1992), sua regulação na função espermática ainda não está esclarecida.

Bornman et al. (1989) reportaram que a presença da melatonina no plasma seminal humano não afeta a motilidade espermática, no entanto, Van Vuuren et al. (1992), sugeriram que a melatonina pode ter um efeito, pois encontraram correlação negativa entre os níveis de melatonina no sêmen e as características seminais, de modo que níveis relativamente baixos de melatonina (<18 pg/mL) estiveram associados com alta incidência (63%) de progressão espermática anormal.

Georgiev e colaboradores, em 2012, demonstraram *in situ*, a presença de receptores de membrana da melatonina em gametas masculinos humanos competentes e afirmaram que a concentração da melatonina no sêmen humano indica que níveis picomolares correspondem à ativação de receptores de alta afinidade nos espermatozoides e que estes estão ligados à alterações na motilidade espermática, durante a capacitação *in vitro*.

Em 2000, Gavella e Lipovac demonstraram a habilidade da melatonina em suprimir experimentalmente a peroxidação lipídica na membrana espermática em homens inférteis.

Em condições em que a geração testicular de radicais livres foi acelerada experimentalmente, a melatonina reduziu marcadamente o nível de estresse oxidativo gonadal (SEMERCIOZ et al., 2003). A indoleamina foi ainda efetiva na proteção de espermatozoides contra os efeitos adversos do agente peroxidativo homocisteína (SOÑMEZ; YUCE; TURK, 2007), assim como contra os danos oxidativos causados pelo mercúrio (RAO; GANGADHARAN, 2008), ambos em ratos, além da injúria no DNA causada por pesticidas organofosforados em camundongos (SARABIA; MAURER; BUSTOS-OBREGÓN, 2009). A melatonina ainda claramente reduziu o estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio, durante a estocagem dos espermatozoides e desenvolvimento da maturação e fertilização *in vitro*, em suínos (JANG et al., 2010).

Em condições fisiológicas, a melatonina também vem mostrando efeitos benéficos. Aprimorou os parâmetros de motilidade espermática e viabilidade, em humanos (DU PLESSIS; HAGENAAR; LAMPIAO, 2010; ORTIZ et al., 2011); aumentou a hiperativação em espermatozoides de *hamsters* (FUJINOKI, 2008); melhorou a integridade de membrana plasmática, em espermatozoides bovinos criopreservados, após a descongelação (ASHRAFI; KOHRAM; ARDABILI, 2013); afetou positivamente a viabilidade, motilidade, concentrações de ATP, integridade de DNA e habilidade fertilizante após a descongelação, em ovinos (SUCCU et al., 2011), melhorou a atividade mitocondrial e qualidade espermática após a congelação, descongelação e sexagem, em bubalinos (LI et al., 2012); além de prevenir a peroxidação lipídica e seus eventos relacionados em equinos (SILVA et al., 2011).

2.4 ÁCIDO FERÚLICO

Ácido ferúlico é o nome comum para ácido 4-hidroxi-3-metoxicinâmico (KOH, 2012). Trata-se de um componente orgânico da parede celular de plantas, que decorre do metabolismo dos aminoácidos tirosina e fenilalanina, sendo um dos principais constituintes de frutas e vegetais como laranja, maçã, tomate, cenoura, além de sementes como arroz, trigo, aveia, café, entre outros (ITAGAKI et al., 2009; LANZAFAME et al., 2009).

É um composto fenólico que exhibe uma ampla gama de efeitos terapêuticos contra diversas doenças, incluindo câncer, diabetes, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares. Além de ter sido aprovado no Japão como um aditivo alimentar visando prevenir a auto-oxidação (JFCRF, 1996; LANZAFAME et al., 2009).

Ocorre na forma de dois estereoisômeros: o ácido *trans*-ferúlico e o ácido *cis*-ferúlico (URBANIAK; SZELA; MOLSKI, 2013). Estereoisômeros são moléculas que possuem a mesma composição atômica, mas diferentes arranjos espaciais dos átomos, sendo que no isômero *cis* os grupos estão do mesmo lado e no *trans* eles estão em lados opostos, em relação ao plano de referência (IUPAC, 1997). O ácido ferúlico isolado das plantas, normalmente existe na forma do isômero *trans* (GRAF, 1992).

A função biológica específica do ácido ferúlico é sua atividade antioxidante, isto é sua habilidade em eliminar formas reativas do oxigênio e radicais livres, e essa propriedade vem sendo confirmada por diversos estudos (KOH, 2012; URBANIAK; SZELA; MOLSKI, 2013).

Possui três razões estruturais que podem contribuir à essa capacidade, uma delas é a presença de grupos doadores de elétrons no anel benzeno, que dá ao ácido ferúlico a propriedade adicional de interromper reações em cadeia de radicais livres. A outra é o fato de se tratar de um ácido carboxílico e conter uma dupla ligação C-C, o que pode proporcionar sítios de ataque aos radicais livres impedindo assim que eles acometam a membrana. E por último, esse grupo carboxílico, também produz um “ancoramento”, por onde o ácido ferúlico se liga nas bicamadas lipídicas das membranas, promovendo certa proteção contra a peroxidação lipídica (ITAGAKI et al., 2009).

Seu conhecido efeito antioxidante atua na remoção de radicais peroxila, hidroxila, do superóxido e do ácido hipocloroso (SHANTHAKUMAR et al., 2012), mostrando também alguma atividade sobre peroxinitritos (PANNALA et al., 1998).

Além da remoção direta de ERs, o ácido ferúlico pode quelar o íon ferroso e diminuir a formação do radical hidroxila, uma vez que ele é formado através da Reação de Fenton, que trata-se de uma reação ferro dependente (SUDHEER et al., 2007).

A utilização do potencial antioxidante do ácido ferúlico vem mostrando resultados: inibiu 70,9% da peroxidação lipídica em homogeneizado de cérebro de ratos (SHARMA, 1976), assim como a carcinogênese quimicamente induzida na mesma espécie (IMAIDA et al., 1990), além do tumor de pele em camundongos (HUANG et al., 1988).

Kanski et al. (2002) incubando estruturas neuronais com a sonda fluorescente DCFH – DA utilizada para mensurar EROs, juntamente com um indutor de estresse oxidativo e utilizando um espectrômetro para detecção da fluorescência emitida, obteve a menor oxidação nas amostras incubadas com 250 μ M de ácido ferúlico ($P < 0.00001$), em comparação com as outras moléculas utilizadas. No mesmo trabalho, o ácido ferúlico também foi mais eficiente na proteção contra a peroxidação lipídica ($P < 0.05$), e contra a oxidação proteica ($P < 0.05$), em comparação com os outros antioxidantes testados.

O ácido ferúlico parece ter algum efeito também, sobre o sistema antioxidante enzimático, pois a exposição à radiação gama em camundongos albinos por 24 horas, resultou no declínio na atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, no entanto, o pré tratamento com ácido ferúlico reverteu significativamente a atividade das enzimas, 24 horas após a irradiação (SHANTHAKUMAR et al., 2012).

No tocante à reprodução, Zheng e Zhang (1997), incubando sêmen humano com diferentes concentrações de ácido ferúlico, por até seis horas, mostraram aumento na motilidade e viabilidade espermática, a partir da diminuição na peroxidação lipídica das membranas e aumento nos níveis intracelulares de AMPc e GMPc, tanto em indivíduos férteis quanto inférteis.

O propólis é uma resina natural, com uma composição química complexa, formada, entre outras coisas, por diversos compostos fenólicos, entre eles, o ácido ferúlico. Pesquisadores, em 2006, testaram a proteção exercida por ele no espermatozoide humano, tratado com agentes tóxicos e EROs. E obtiveram como resultado, a inibição da peroxidação lipídica das membranas, apesar do forte ataque oxidativo induzido, hipotetizando o seu uso na prevenção e tratamento da infertilidade masculina (RUSSO et al., 2006).

O gama-orizanol, um composto retirado do óleo de arroz, e conhecido pelas suas propriedades antioxidantes, é formado por uma variedade de ésteres do ácido ferúlico e portanto, possui uma estrutura fenólica similar (CHOTIMARKORN; USHIO, 2008). Além de diversos outros fins, como em indústria farmacêutica e cosmética e como aditivo alimentar, o gama-orizanol vem sendo utilizado como suplemento da dieta de ganhos, visando melhorar as características seminais. Em alguns casos, mostrou resultados positivos, aumentando significativamente a funcionalidade das membranas e a motilidade, em animais suplementados, provavelmente devido ao seu potencial antioxidante (ARRUDA et al., 2010).

2.5 MIOINOSITOL

O inositol é um hexahidroxíciclohexano (BEEMSTER; GROENEN; STEEGERS-THEUNISSEN, 2002). Pode ser classificado como açúcar, ou poliálcool cíclicos, pois contem um anel de seis átomos de carbono e seis grupos hidroxila, sendo por isso classificado por alguns autores como álcool-açúcar (ALMEIDA et al., 2003; PAPALEO et al., 2009; CONDORELLI et al., 2012).

Os inositóis podem ser arranjados em nove estereoisômeros, sendo que o mais importante na natureza é o mioinositol (ALMEIDA et al., 2003). O mioinositol e seus vários derivados bioquímicos são amplamente distribuídos nos tecidos e células de mamíferos, onde exercem importantes funções biológicas (BEEMSTER; GROENEN; STEEGERS-THEUNISSEN, 2002). É sintetizado a partir da glicose-6-fosfato, que trata-se do principal produto da glicólise. Nesse processo, participam duas enzimas: a mio-1-fosfato sintase e a mio monofosfatase-1, que estão presentes em altas concentrações também nos testículos humanos (CONDORELLI et al., 2011; CONDORELLI et al., 2012).

No sistema de transdução do sinal celular, o mioinositol é um precursor dos chamados segundos mensageiros, que constituem a última ligação da cadeia de comunicação intracelular, antes da resposta fisiológica (ALMEIDA et al., 2003). Estando assim envolvido na regulação de diversas funções celulares, entre elas, a regulação da concentração de cálcio intracelular, mediação da cascata de insulina, proliferação e diferenciação celular, formação de membrana celular, síntese de lipídeos, entre outros (PAPALEO et al., 2009; COLONE et al., 2010; CONDORELLI et al., 2011).

Atua como segundo mensageiro também no espermatozoide, regulando as concentrações intracelulares de cálcio, através da atuação na membrana plasmática, mitocôndria, acrossomo e região do colo. Essa ativação de mecanismos intracelulares induz um aumento no cálcio citoplasmático e consequentemente, uma maior concentração do cálcio mitocondrial, estimulando a respiração e a produção de ATP (CONDORELLI et al., 2011).

Desde a revisão de Beemster, Groenen e Steegers-Theunissen, em 2002, cada vez mais evidências sustentam o papel fisiológico e terapêutico do mioinositol na reprodução humana (PAPALEO et al., 2009). Estudos recentes sugeriram seu envolvimento tanto na maturação quanto na migração espermática pelo epidídimo (COLONE et al., 2010; CONDORELLI et al., 2011).

A concentração de mioinositol nos túbulos seminíferos parece maior que a do plasma seminal, no entanto seu real papel ainda é desconhecido (CONDORELLI et al., 2011). Além dos túbulos seminíferos, secreções do trato reprodutivo masculino também são ricas em mioinositol (BEEMSTER; GROENEN; STEEGERS-THEUNISSEN, 2002).

O mioinositol é transportado para dentro das células espermáticas a partir de uma proteína cotransportadora de sódio/mioinositol, a SLC5A3 (CONDORELLI et al., 2011). A expressão da proteína pelas células de Sertoli é sensível às alterações osmóticas, aumentando sua expressão quando em microambiente hiperosmótico. O mioinositol, portanto, atua

também como um osmólito, podendo exercer um papel na osmoregulação do fluido seminal (PAPALEO et al., 2009; CONDORELLI et al., 2012).

Sabe-se que o mioinositol atua como um regulador da osmolaridade e volume celular em células somáticas (FÜRST et al., 2002) e também já foi utilizado com esse fim em embriões de camundongos (KANE; NORRIS; HARRISON, 1992).

Em espermatozoides, Yeung et al. (2004), utilizaram camundongos infértéis, visando estudar o efeito dos osmólitos epididimais no controle do volume celular. Estes apresentaram menor quantidade de glutamato e mioinositol nos espermatozoides e consequente habilidade reduzida de regular o volume celular.

Apesar dos mecanismos regulatórios da célula espermática em resposta ao estresse osmótico não estarem bem esclarecidos, existem evidências de interação entre os estresses osmótico e oxidativo nas células de mamíferos (BURNAUGH et al., 2010).

A exposição do espermatozoide equino à condições hipo ou hiperosmóticas resulta em um aumento na geração do ânion superóxido pelas células viáveis (BURNAUGH et al., 2010). Isso indica que existe um efeito recíproco entre esses dois estressores (osmótico e oxidativo), através de um mecanismo que não está bem caracterizado (BALL, 2008) e que, portanto, ao auxiliar na regulação da osmolaridade, o mioinositol exerce também um efeito antioxidante indireto.

Independente desse efeito, alguns autores evidenciaram a atividade antioxidante do inositol e seus derivados, preferencialmente atingindo a mitocôndria e principalmente contra ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila (COLONE et al., 2010; CONDORELLI et al., 2011).

Colone et al. (2010), estudaram o efeito do inositol como agente antioxidante no tratamento da infertilidade masculina e na melhora na qualidade do espermatozoide utilizado na fertilização, em procedimentos de reprodução assistida. Perceberam que espermatozoides de indivíduos sofrendo de oligoastenoteratospermia, ou seja, redução no número e na motilidade, em conjunto com alterações na morfologia, se apresentavam inteiramente cobertos por um material fibroso amorfo, causando excessiva viscosidade no fluido seminal e reduzindo a mobilidade celular. A incubação com mioinositol reduziu a presença desse material e melhorou o aspecto morfológico das mitocôndrias, que no grupo não tratado mostrava danos nas cristas mitocondriais.

Condorelli et al. em 2012 visando estudar o efeito do mioinositol na função mitocondrial e na motilidade, em espermatozoides humanos, incubaram espermatozoides de indivíduos normais e de portadores de oligoastenoteratospermia com mioinositol e obtiveram

aumento na porcentagem de células com alto potencial de mitocôndria nos indivíduos oligoastenoteratospérmicos, que ao final do período de incubação, apresentavam a mesma porcentagem que os indivíduos normospérmicos. Estes, por sua vez, não apresentaram o aumento relatado no outro grupo. As motilidades tanto total, quanto progressiva também aumentaram em ambos os grupos.

Bucak et al. (2010) criopreservaram sêmen bovino na presença de inositol e outros antioxidantes. As amostras congeladas com inositol apresentaram maior motilidade e menor dano de DNA, em comparação com as amostras do grupo controle.

Os estudos com mioinositol são extremamente recentes, inclusive em humanos, Condorelli et al. em 2011 relataram ser o primeiro trabalho mostrando que as outras características funcionais, como fragmentação de DNA e condensação da cromatina, não melhoraram após o tratamento com mioinositol, sugerindo que o principal local de ação da molécula, por onde ela exerce os efeitos positivos na motilidade, é a mitocôndria.

2.6 MÉTODOS DE ANÁLISE DO SÊMEN EQUINO

A manutenção do potencial fertilizante do espermatozoide depende da integridade e funcionalidade de diferentes estruturas celulares, o que na prática, dificulta o desenvolvimento de um único teste laboratorial preditor do potencial fertilizante do sêmen com acurácia (CELEGHINI et al., 2007). Assim, pesquisadores têm buscado a melhor associação de testes estruturais e funcionais para estimar a integridade das células espermáticas e que apresente alta correlação com as taxas de prenhez (JANUSKAUSKAS; JOHANNISSON; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2001).

Quanto mais características espermáticas são avaliadas em uma amostra de sêmen, maior o valor do prognóstico da fertilidade *in vitro* (TARTAGLIONE; RITTA, 2004). Recentes avanços nas biotécnicas aplicadas à andrologia têm fornecido novos meios de se avaliar a capacidade funcional de espermatozoides em várias espécies (GARNER; JOHNSON, 1995).

2.6.1 Cinética espermática

Motilidade espermática é determinada pela porcentagem total de espermatozoides que estão se movendo, ou a porcentagem dos que estão se movendo progressivamente, no caso da motilidade progressiva (LOVE, 2011).

A motilidade é o parâmetro mais frequentemente utilizado para medir a qualidade de um ejaculado, dado que se correlaciona com a viabilidade e integridade estrutural do espermatozoide e consequentemente com a fertilidade (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002; AITKEN et al., 2012).

Pode ser analisada de forma subjetiva, sob microscopia óptica, colocando-se uma gota do sêmen entre lâmina e lamínula e estimando-se sua porcentagem visualmente. Essa é a técnica mais utilizada na rotina laboratorial e detentora de grande valor, principalmente para diferenciar sêmen de baixa e alta qualidade (ARRUDA et al., 2011).

Entretanto, estudos reportam que este tipo de análise manual é imprecisa, mesmo quando executada por investigadores experientes, pois é influenciada por uma alta variação entre observações e observadores. Esta imprecisão deriva, em parte, da natureza subjetiva dos testes usados, da variabilidade entre técnicos e das diferenças na implementação de padrões para a avaliação (ARRUDA et al., 2007).

Atualmente, vários sistemas de análises computadorizadas das células espermáticas (CASA, Computer Assisted Sperm Analysis) estão disponíveis comercialmente, porém, o sistema mais amplamente utilizado é o *Hamilton Thorne Sperm Analyzer* (Hamilton Thorne Inc., Beverly, MA, USA; AITKEN et al., 2012).

O sistema CASA é baseado na captura de sucessivas imagens microscópicas, que são então digitalizadas. Os espermatozoides móveis observados nessas imagens são identificados nas imagens subsequentes, suas trajetórias estabelecidas, matematicamente processadas, e então, definidas em forma numérica. Os resultados desse processamento são refletidos em uma série de características que precisamente definem o movimento exato para cada espermatozoide individualmente (QUINTERO-MORENO et al., 2003).

As características geradas pelo sistema são: Motilidade Total (%), referente à população de células que estão se movendo com uma velocidade mínima pré determinada, em relação ao total; Motilidade Progressiva (%), que se refere à porcentagem de células movendo-se progressivamente; Velocidade de Trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), é a velocidade média ininterrupta do trajeto da célula; Velocidade Progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), é a velocidade média percorrida em

linha reta entre os pontos inicial e final do trajeto; Velocidade Curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), que trata-se da velocidade média mensurada de ponto a ponto do trajeto percorrido pela célula; Amplitude Lateral de Cabeça (ALH, μm), é a largura média da oscilação da cabeça conforme a célula se move; Frequência de Batimentos (BCF, Hz), é a frequência com que a cabeça do espermatozoide move-se para trás e para frente durante um trajeto percorrido; Retilinearidade (STR, %), é o valor médio da proporção entre VSL/VAP; Linearidade (LIN, %), é o valor médio da proporção entre VSL/VCL; e Velocidade Rápida (%) (ARRUDA, 2000; ARRUDA et al., 2011).

Ou seja, os sistemas CASA não só permitem determinar a porcentagem de espermatozoides móveis e imóveis, mas também caracteriza o padrão de motilidade da célula espermática. Combinações de diferentes parâmetros de velocidade permitem a definição de diferentes subpopulações espermáticas e parece ser melhor relacionado com fertilidade do que um único parâmetro (AURICH, 2005).

Love, em 2011 encontrou juntamente com a porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais, a motilidade total como uma das variáveis apresentando maior correlação positiva com fertilidade, sendo os coeficientes de correlação de 0,37 para correlação com taxa de prenhez por estação; 0,59 para taxa de prenhez por ciclo e 0,64 para prenhez no primeiro ciclo do ano. A motilidade progressiva também se correlacionou com a porcentagem de prenhez no primeiro ciclo do ano ($r=0,56$) e com a porcentagem de prenhez por ciclo ($r=0,52$).

Uma das maiores questões chave a ser dirigida quando se considera a relação entre movimento espermático e fertilidade é que a motilidade de espermatozoides mamíferos não é uma constante e única entidade, mas está constantemente mudando em resposta à demanda fisiológica da célula (AITKEN et al., 2012).

2.6.2 Integridade das membranas plasmática, acrossomal e função mitocondrial

Dentre os exames que buscam a predição da capacidade fertilizante do sêmen, a técnica que utiliza sondas fluorescentes vem ganhando importância por sua característica de marcar estruturas específicas das células, detectar integridade estrutural ou funcionalidade de

organelas e compartimentos celulares, de forma clara (ARRUDA et al., 2007; ARRUDA et al., 2011).

Uma grande diversidade de sondas fluorescentes vem sendo desenvolvida para avaliação seminal (CELEGHINI et al., 2010b). A combinação dessas sondas possibilita a avaliação de diversos compartimentos espermáticos simultaneamente, como exemplo, membranas plasmática e acrossomal, potencial mitocondrial, translocação de fosfolípidos de membrana, índice de caspase-ativada, índice de fragmentação de DNA, integridade do flagelo, peroxidação lipídica, entre outros (ARRUDA et al., 2011).

A determinação da integridade funcional da membrana plasmática vem sendo o objetivo de muitos estudos, isso porque o dano na membrana plasmática resulta em perda irreversível de motilidade e/ou capacidade fertilizante do espermatozoide (AURICH, 2005).

Várias sondas fluorescentes podem ser utilizadas para a avaliação da integridade da membrana plasmática espermática, todavia, o iodeto de propídio (PI) vem se destacando em pesquisas, pela sua facilidade de preparação e aplicação da técnica e estabilidade e eficiência, seja isoladamente ou associada à outra sonda fluorescente (ARRUDA et al., 2007).

O PI é um corante fluorescente de alta intensidade, que por ser impermeável à membrana plasmática, somente se acopla ao DNA de espermatozoides cuja membrana esteja danificada, corando o núcleo em vermelho e permitindo a diferenciação entre células com membrana plasmática intacta e lesada (GARNER; THOMAS; GRAVANCE, 1999; AURICH, 2005).

O Hoechst 33342 (H342) também apresenta especificidade ao DNA e quando associado à outra sonda de coloração distinta, como o PI por exemplo, atua como um marcador de membrana plasmática intacta, emitindo fluorescência azul (CELEGHINI et al., 2007; ARRUDA et al., 2011).

Outra análise muito importante é a da integridade do acrossomo. Isso porque o acrossomo intacto é necessário para que ocorra a reação acrossomal, fundamental à penetração do espermatozoide na zona pelúcida e à fusão com a membrana plasmática do oócito, eventos que precedem a fertilização (OURA; TOSHIMORI, 1990; THOMAS et al., 1997; FLESCHE; GADELLA, 2000).

As lecitinas fluorescinadas vêm sendo utilizadas para avaliar a integridade do acrossomo, em diversas espécies. Elas se ligam de forma específica à glicoconjugados presentes no acrossomo. A aglutinina de *Pisum sativum* (PSA), oriunda da ervilha, é uma delas e quando conjugada a isotiocionato de fluoresceína (FITC), marca com sucesso o acrossomo espermático na cor verde amarelada, o que facilita a visualização e a identificação

dos acrossomos lesados (ARRUDA, 2000; CELEGHINI et al., 2004; ARRUDA et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2008).

A energia necessária para a motilidade espermática é provida pelas mitocôndrias, que se localizam na peça intermediária (GRAVANCE et al., 2000). Portanto, a perda do potencial de membrana mitocondrial é associada com perda da motilidade, principalmente em equinos, espécie cujos espermatozoides são dependentes da fosforilação oxidativa para geração de ATP e então, particularmente suscetíveis a mudanças na função mitocondrial (AITKEN et al., 2012).

O potencial de membrana da mitocôndria vem sendo utilizado como uma medida da função mitocondrial e está ligado a uma série de funções, incluindo síntese de ATP, homeostase de cálcio e transporte de metabólitos (BAUMBER et al., 2000).

A sonda fluorescente iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazol-carbocianina-iodado (JC-1) possui a habilidade única de classificar diferencialmente mitocôndrias com alto e baixo potencial de membrana. Na presença de alto potencial de mitocôndria, o JC-1 forma agregados multiméricos (J-agregados) que emitem fluorescência vermelho-alaranjada e em baixo potencial de mitocôndria forma monômeros que emitem fluorescência esverdeada (GRAVANCE et al., 2000; CELEGHINI et al., 2007; SILVA et al., 2011).

A avaliação simultânea da integridade das membranas plasmática e acrossomal, assim como a função mitocondrial, pode ser realizada pela técnica prática de associação das sondas fluorescentes PI, H342, FITC-PSA e JC-1, inclusive em espermatozoides equinos (CELEGHINI et al., 2007; NASCIMENTO et al., 2008; CELEGHINI et al., 2010a; CELEGHINI et al., 2010b).

2.6.3 Mensuração da produção de espécies reativas de oxigênio

Como dito anteriormente, as EROs exercem influência tanto sobre o sêmen equino *in natura*, quanto refrigerado (BALL et al., 2001; AURICH, 2008; AITKEN et al., 2012). Portanto, métodos que permitem quantificação das EROs geradas pelos espermatozoides são importantes para que se entenda tanto os aspectos fisiológicos, quanto citopatológicos das EROs na função espermática (BURNAUGH; SABEUR; BALL, 2006). Entre os métodos utilizados para mensuração celular de ERs, destaca-se a utilização da sonda fluorescente

2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA). Desde o primeiro relato do seu uso, como um ensaio fluorimétrico, em 1965, tornou-se popular a utilização da sonda com esse intuito, também em espermatozoides, principalmente com o auxílio do citômetro de fluxo (WANG; JOSEPH, 1999; MAHFOUZ et al., 2010; MINERVINI et al., 2010; GUTHRIE; WELCH, 2012).

A teoria por trás da sua utilização é que por ser não iônica e não polar, a DCFH-DA atravessa membranas celulares e então, é hidrolisada enzimaticamente por esterases intracelulares à um estado não fluorescente. Ao passo que, na presença de EROs, é oxidada à sua forma altamente fluorescente (diclorofluoresceína), emitindo fluorescência intracelular, que pode então, ser usada como um indicador do estresse oxidativo geral das células (WANG; JOSEPH, 1999; KANSKI et al., 2002).

Muitos estudos utilizaram a sonda para quantificar o estresse oxidativo celular com microscopia de fluorescência. No entanto, esse método pode apresentar problemas por induzir fotooxidação da sonda, com consequente emissão de fluorescência, devido ao tempo de exposição à luz durante a localização e focalização das células pelo microscópio. Visando prevenir a superestimação do estresse oxidativo devido a isso, que se opta pela utilização do fluorímetro, um instrumento equipado com excitação de luz rápida e instantânea captação de fluorescência, e que, portanto, não induz fotooxidação excessiva. Trata-se de um método fácil e eficiente, com baixa variabilidade e que pode ser adaptado à avaliação da eficácia de antioxidantes em diversos tipos celulares (WANG; JOSEPH, 1999).

Apesar de alguns autores relatarem a especificidade da sonda por peróxido de hidrogênio (MAHFOUZ et al., 2010; MACÍAS-GARCÍA et al., 2012), ela pode ser oxidada também pelo radical peroxila. O óxido nítrico e o peroxinitrito também podem oxidar a sonda e emitir fluorescência, porém seu efeito oxidante sobre ela é mais fraco, sendo necessárias maiores concentrações para que isso ocorra (WANG; JOSEPH, 1999).

Baseando-se em nossa revisão, poucos trabalhos utilizaram a sonda fluorescente DCFH-DA, com o auxílio do fluorímetro, visando mensurar EROs, em espermatozoides (RUSSO et al., 2006; ABOUA et al., 2012).

3 CAPÍTULO 1 - EFEITO DO USO DOS ANTIOXIDANTES MELATONINA, ÁCIDO FERÚLICO E MIOINOSITOL SOBRE AS CARACTERÍSTICAS DE MOTILIDADE, INTEGRIDADE DE MEMBRANAS E PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM SÊMEN EQUINO REFRIGERADO.

RESUMO

O estresse oxidativo é prejudicial a diversas características espermáticas, podendo levar a redução da fertilidade, inclusive no sêmen refrigerado. Poucos estudos foram realizados utilizando-se a melatonina com o intuito de melhorar as características espermáticas em equinos. O mioinositol e o ácido ferúlico, por sua vez, nunca foram utilizados nessa espécie. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência desses compostos nas características do sêmen equino refrigerado. Para isso, foram utilizadas quatro ejaculados, de quatro animais conhecidamente férteis, com idade entre 4 e 8 anos. Após a coleta, o sêmen foi distribuído entre os quatro tratamentos, sendo eles, melatonina, ácido ferúlico, mioinositol e controle, utilizando-se diluidor á base de leite desnatado, na concentração de 25 milhões de espermatozoides por mL. O sêmen foi refrigerado à 5°, sob uma curva de refrigeração de 0,09°C/min e avaliadas com 0, 4 e 8 horas de refrigeração, quanto às características de motilidade, integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e quantificação de produção de EROs. As características de motilidade não foram afetadas pelos tratamentos, com exceção da Amplitude Lateral de Cabeça (ALH, $\mu\text{m/s}$), que foi maior nas amostras tratadas com mioinositol ($8,34 \pm 0,21$), em relação ao grupo controle ($7,87 \pm 0,20$). Foi observado efeito de interação entre tempo e tratamento para a variável Velocidade de Trajeto (VAP; $P < 0,05$). Quanto à integridade das membranas, todas as variáveis sofreram efeito dos tratamentos, com exceção da porcentagem de células com membrana plasmática intacta (MPI). A porcentagem de células com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e alto potencial de mitocôndria (PIAIA) foi maior nos grupos tratados com melatonina ($78,07 \pm 2,02$) e com ácido ferúlico ($78,78 \pm 1,66$), em comparação ao grupo controle ($73,75 \pm 2,01$). A porcentagem de células com alto potencial de mitocôndria (APM), também foi maior nos grupos tratados com melatonina ($80,11 \pm 1,85$) e com ácido ferúlico ($81,01 \pm 1,50$), em relação ao grupo controle ($76,56 \pm 1,99$). Já a porcentagem de membrana acrossomal intacta (MAI) foi maior no grupo tratado com melatonina ($99,69 \pm 0,07$), em relação a todos os outros grupos ($99,41 \pm 0,09$; $99,33 \pm 0,09$; $99,39 \pm 0,09$, nos

grupos mioinositol, ácido ferúlico e controle, respectivamente). A fluorescência emitida, relativa à quantidade de EROs presente na amostra não foi alterada pelos tratamentos, em nenhum dos tempos. Com isso conclui-se que a adição de melatonina e ácido ferúlico aumentou a porcentagem de células com alto potencial de mitocôndria, sugerindo a adição desses compostos ao diluidor, visando maior manutenção da viabilidade por até 8 horas de refrigeração.

Palavras-chave: Sondas fluorescentes. DCFH-DA. Fluorímetro. JC-1. PI. FITC-PSA.

ABSTRACT

Oxidative stress is detrimental to several sperm characteristics such as motility, plasma, acrosomal and mitochondrial membrane integrity, and can lead to reduced fertility, also in cooled semen. Few studies were performed using melatonin intending an improvement in equine sperm characteristics. Para isso, foram utilizadas quatro ejaculados, de quatro animais conhecidamente férteis, com idade entre 4 e 8 anos. Myoinositol and ferulic acid, in turn, were never used in this species. The objective of the present study was to evaluate the influence of these compounds in equine cooled semen characteristics. Four collections from four stallions of known fertility aged between 4 and 8 years old were used. After collection, semen was distributed in one of the four treatments, melatonin, ferulic acid, myoinositol and control. A skim milk based extender was used and semen was diluted to a final concentration of 25 million sperm per mL. Samples were cooled at 5°C, at a cooling rate of 0.09°C/min and evaluated at 0, 4 and 8 hours of cooling. Characteristics analyzed were motility (CASA), plasma and acrosomal membrane integrity mitochondrial membrane potential (using fluorescent probes PI, H342, FITC-PSA e JC-1, using epifluorescence microscopy), and reactive oxygen species production quantification (using DCFH-DA fluorescent probe, by fluorimetry. Data obtained were analyzed using SAS program, 9.3 version (SAS, 2011). Motility characteristics were not affected by treatments, with the exception of average of lateral head displacement (ALH, $\mu\text{m/s}$), which was greater in myoinositol treated samples (8.34 ± 0.21), in comparison to the control group (7.87 ± 0.20). An interaction effect was detected between time and treatment for the velocity of the average path (VAP; $P < 0.05$). Regarding membrane integrity, all variables were affected by treatments, with the exception of the percentage of intact plasma membrane cells (IPM). The percentage of cells with intact membranes (intact plasma membrane, intact acrosome, high mitochondrial potential; IPIAH) was greater for the groups treated with melatonin (78.07 ± 2.02) and ferulic acid (78.78 ± 1.66), comparing to the control group (73.75 ± 2.01). The percentage of cells with high mitochondrial potential (HMP) was also greater in melatonin treated group (80.11 ± 1.85) and ferulic acid (81.01 ± 1.50) comparing to the control group (76.56 ± 1.99). Percentage of cells with intact acrosomal membrane (IAM) was higher in melatonin treated group (99.69 ± 0.07) than all the other groups (99.41 ± 0.09 ; 99.33 ± 0.09 ; 99.39 ± 0.09 ; myoinositol, ferulic acid and control, respectively). Concerning reactive oxygen species in the sample, emitted fluorescence was not altered by treatments at any moment evaluated. It can be concluded that the addition of melatonin and ferulic acid the percentage of high mitochondrial potential cells,

suggesting a beneficial utilization of these compounds in the extender for a greater maintenance of viability up to 8 hours of cooling.

Keywords: Fluorescent probe. DCFH-DA. Fluoremeter. JC-1. PI. FITC-PSA.

3.1 INTRODUÇÃO

A refrigeração e transporte do sêmen de garanhões para posterior inseminação artificial são práticas rotineiras na criação de equinos (ARRUDA et al., 2009). A refrigeração diminui a atividade metabólica dos espermatozoides, reduz o crescimento microbiano e subsequentemente, mantem a viabilidade do sêmen por maiores períodos de tempo (KATILA, 1997).

O desenvolvimento de meios extensores e meios de processamento do sêmen vem resultando na melhora da qualidade durante o armazenamento, no entanto, a longevidade do espermatozoide equino ainda é limitada quando comparada a de suínos e ruminantes (AURICH, 2005).

Resultados de pesquisas têm sugerido que a diminuição na qualidade do espermatozoide equino após o armazenamento a 5°C pode ser devido ao dano oxidativo causado por um aumento na geração de EROs durante a refrigeração (ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2011).

As EROs e as ERNs estão presentes em todos os organismos que vivem em ambiente aeróbico (AZIZ et al., 2010). Em níveis fisiológicos são requeridas para as funções espermáticas normais como hiperativação, capacitação e reação acrossomal (IULIIS et al., 2009).

No entanto, o desbalanço entre a produção dessas moléculas e a habilidade do sistema biológico de prontamente detoxificar os intermediários reativos, ou facilmente reparar os danos é conhecido como estresse oxidativo (DU PLESSIS; HAGENAAR; LAMPIAO, 2010).

O estresse oxidativo vem sendo associado com o declínio da motilidade espermática (AITKEN e BAKER, 2004), perda da fluidez e da integridade da membrana plasmática, (BAUMBER et al., 2000), alterações na função mitocondrial (SILVA, et al., 2011), alterações de cromatina (BURNAUGH; SABEUR; BALL, 2006), danos ao sistema antioxidante enzimático (GRIVEAU et al., 1995) e lesão na membrana acrossomal (MARQUES et al., 2002). Como consequência, tem-se a redução da função, tornando a célula espermática incapaz de fertilizar o oócito, e produzir uma prenhez viável (RAO; GANGADHARAN, 2008; DU PLESSIS; HAGENAAR; LAMPIAO, 2010).

Apesar de vários antioxidantes já terem sido utilizados com o intuito de amenizar os danos causados pelas ERs e melhorar as características espermáticas, a melatonina, o mioinositol e o ácido ferúlico são compostos nunca antes estudados no sêmen equino, ou poucas vezes, no caso da melatonina.

A melatonina, é o principal hormônio produzido e secretado pela glândula pineal (CLAUSTRAT; BRUN; CHAZOT, 2005). Participa de diversas funções fisiológicas, incluindo as do sistema imune, o controle dos ritmos circadianos e o controle da reprodução em espécies sazonais (ASHRAFI; KOHRAM; ARDABILI, 2013).

Segundo grande conjunto de evidências é o maior removedor de moléculas reativas tanto à base de oxigênio quanto nitrogênio (CARPENTIERI et al., 2012). A indoleamina elimina os produtos da decomposição de peroxinitritos, possui alta eficiência como removedor dos radicais hidroxila, peroxila, assim como o ânion superóxido, o peróxido de hidrogênio, o ácido hipocloroso e o óxido nítrico (ALLEGRA et al., 2003), além de estimular a atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione redutase (KARBOWNIK; REITER, 2000). Devido às suas propriedades antioxidantes, a melatonina pode ser adicionada aos diluidores visando melhorar as características seminais durante o armazenamento (MARTÍN-HIDALGO et al., 2011).

O inositol é um hexahidroxíciclohexano (BEEMSTER; GROENEN; STEEGERS-THEUNISSEN, 2002). Pode ser arranjado em nove estereoisômeros, sendo que o mais importante na natureza é o mioinositol (ALMEIDA et al., 2003). O mioinositol e seus vários derivados bioquímicos são amplamente distribuídos nos tecidos e células de mamíferos onde exercem importantes funções biológicas (BEEMSTER; GROENEN; STEEGERS-THEUNISSEN, 2002). No sistema de transdução do sinal celular, o mioinositol é um precursor dos chamados segundos mensageiros, que constituem a última ligação da cadeia de comunicação intracelular, antes da resposta fisiológica (ALMEIDA et al., 2003). Estando assim envolvido na regulação de diversas funções celulares, entre elas, a regulação da concentração de cálcio intracelular, mediação da cascata de insulina, proliferação e diferenciação celular, formação de membrana celular, síntese de lipídeos, entre outros (PAPALEO et al., 2009; COLONE et al., 2010; CONDORELLI et al., 2011).

Alguns autores evidenciaram a atividade antioxidante do inositol e seus derivados, preferencialmente atingindo a mitocôndria e principalmente contra ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila (COLONE et al., 2010; CONDORELLI et al., 2011).

Ácido ferúlico trata-se de um componente orgânico da parede celular de plantas, que decorre do metabolismo dos aminoácidos tirosina e fenilalanina, sendo um dos principais constituintes de frutas, vegetais e sementes (ITAGAKI et al., 2009; LANZAFAME et al., 2009).

É um composto fenólico que exibe uma ampla gama de efeitos terapêuticos contra diversas doenças, incluindo câncer, diabetes, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares. Além de ter sido aprovado no Japão como um aditivo alimentar visando prevenir a auto-oxidação (JFCRF, 1996; LANZAFAME et al., 2009).

A função biológica específica do ácido ferúlico é a sua atividade antioxidante, isto é sua habilidade em eliminar formas reativas do oxigênio e radicais livres, e essa propriedade vem sendo confirmada por diversos estudos (KOH, 2012; URBANIAK; SZELA; MOLSKI, 2013). Assim, seu conhecido efeito antioxidante, atua na remoção de radicais peroxila, superóxido, hidroxila e do ácido hipocloroso (SHANTHAKUMAR et al., 2012), mostrando também alguma atividade sobre peroxinitritos (PANNALA et al., 1998). Além da remoção direta de ERs, o ácido ferúlico pode quelar o íon ferroso e diminuir a formação do radical hidroxila, uma vez que ele é formado através da Reação de Fenton, que trata-se de uma reação ferro dependente (SUDHEER et al., 2007).

Portanto, o presente estudo visa avaliar o efeito desses três compostos antioxidantes, a melatonina, o mioinositol e o ácido ferúlico nas características de motilidade, na integridade das membranas plasmática e acrossomal, no potencial de membrana mitocondrial e na quantidade produzida de EROs, durante o processo de refrigeração do sêmen equino.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Animais e coleta de sêmen

Foram utilizados quatro garanhões de sela, conhecidamente férteis, com idade entre 4 e 8 anos e 4 ejaculados de cada um, totalizando 16 coletas.

As coletas de sêmen foram realizadas utilizando-se vagina artificial modelo Botucatu® (Botupharma, Botucatu, SP), contendo água a 42°C na mucosa interna, após prévia higienização do pênis com algodão e água a 33°C.

3.2.2 Preparação das amostras

Foram utilizados quatro tratamentos, sendo eles a melatonina (MEL), o mioinositol (MIO), o ácido ferúlico (AF) e o controle (CON). As soluções estoque de cada um dos tratamentos utilizados eram previamente preparadas, e então adicionadas ao diluidor à base de leite desnatado, momentos antes da coleta, no volume necessário à atingir para a melatonina a concentração final de $1\mu\text{M}$, para o ácido ferúlico de $165\mu\text{M}$ (ambos diluídos em dimetilsulfóxido) e para o mioinositol de 30 mM (diluído em água deionizada).

O sêmen era então distribuído entre os 4 tratamentos, na concentração de 25 milhões de espermatozoides por mL, em um volume fixo de 40 mL, por tratamento. Para evitar possível efeito da ordenação da diluição nos resultados, a cada coleta de determinado animal, uma nova ordem de diluição e análise era respeitada, de modo que todos os tratamentos passassem uma vez por cada posição ordinal (primeira, segunda, terceira e quarta).

As amostras eram avaliadas nos tempos 0, 4 e 8 horas de refrigeração (T0, T4 e T8). Após realizada a diluição, uma amostra de 2 mL era separada em tubo de microcentrífuga, para que fossem feitas as análises referentes ao Tempo 0. O restante era distribuído entre 8 bisnagas, sendo uma para cada tempo (4 e 8 horas) e tratamento (MEL, AF, MIO e CON), que eram envasadas com um volume total de 15 mL (diluidor + sêmen) retirando-se o máximo de ar possível.

3.2.3 Refrigeração

As bisnagas envasadas eram alocadas, cada uma em seu respectivo dispositivo de refrigeração Botuflex® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil), para que estes não fossem abertos antes do momento das análises, o que poderia atrapalhar o andamento correto da curva de refrigeração.

Também eram colocadas em cada um dos dispositivos, duas bisnagas com água visando completar o volume necessário à garantir que a curva de refrigeração ocorresse adequadamente (150-200 mL), além de dois gelos recicláveis previamente congelados. Os

dispositivos de refrigeração eram então fechadas e abertos novamente apenas no momento da análise. As amostras eram refrigeradas à 5°C, sob uma curva de refrigeração de 0,09°C/min.

3.2.4 Análises Espermáticas

As amostras foram avaliadas com 0, 4 e 8 horas de refrigeração, quanto à motilidade, integridade de membranas espermáticas e quantificação de produção de espécies reativas de oxigênio.

3.2.4.1 *Motilidade*

A avaliação das características de motilidade foram realizadas utilizando-se o aparelho Hamilton Thorne Research Motility Analyser (HTM-IVOS, Version 12.3, Hamilton Thorn Research, Beverly, Massachusetts, USA), colocando-se uma gota de 10 µL sobre câmara de Makler pré-aquecida a 37°C. Foram analisadas as seguintes características: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, µm/s), velocidade progressiva (VSL, µm/s), velocidade curvilínea (VCL, µm/s), amplitude lateral de cabeça (ALH, µm/s), frequência de batimento flagelar (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade (LIN, %) e porcentagem de células rápidas (RAP, %).

3.2.4.2 *Membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial*

Para cada tempo e tratamento, foram separados em tubo de microcentrífuga, 300 µL de cada amostra e adicionados 3 µL de PI (0,5 mg/mL), 2 µL de Hoechst 33342 (2,5mg/mL), 5 µL de JC-1 (153 µM) e 80 µL de FITC-PSA (100 µg/ml). As amostras foram incubadas no escuro, por 8 minutos, a 37°C.

As amostras foram avaliadas a partir de uma preparação úmida entre lâmina e lamínula, contendo 7 µL da amostra e observando-se em aumento de 1000x em microscopia

de epifluorescência (Nikon® – Modelo Eclipse 80i), classificando 200 células entre padrões de coloração. As variáveis observadas através dessa técnica foram: porcentagem de células íntegras, ou seja, membranas plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA); porcentagem de células com membrana plasmática íntegra (MPI); porcentagem de células com alto potencial de membrana mitocondrial (APM) e porcentagem de células com membrana acrossomal íntegra (MAI).

3.2.4.3 *Mensuração das espécies reativas de oxigênio*

As EROs foram mensuradas utilizando-se a sonda 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA). As amostras foram pipetadas em triplicata, ao longo dos poços da microplaca (96 poços), totalizando 100 µL da amostra e 20 µL de DCFH-DA (1mM), e então incubadas no escuro, por 30 minutos, em temperatura ambiente. As leituras foram realizadas com o auxílio de um fluorímetro (BMG Labtech® – Modelo Fluostar Optima), sendo a intensidade de fluorescência medida a 485 nm de emissão e 520 nm de excitação, sendo expressa em unidades relativas de fluorescência (URF).

3.2.5 **Análise estatística**

Os dados obtidos foram analisados pelo programa SAS, versão 9.3 (SAS, 2011). As premissas normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias foram previamente testadas e quando necessárias foram realizadas as devidas transformações e retirada de *outliers*. As variáveis foram analisadas pelo PROC MIXED, utilizando modelo linear misto para medidas repetidas no tempo, sendo considerados os efeitos fixos tratamento, e tempo de refrigeração. O nível de significância considerado foi de 5%. As variáveis que apresentaram efeito significativo foram submetidas ao PROC LSMEANS, com teste de Tukey ajustado. Uma das variáveis (porcentagem de membranas acrossomais íntegras) não respeitou as premissas e então foi submetida ao teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Características de motilidade

As características de motilidade não foram afetadas pelos tratamentos. Com exceção da Amplitude Lateral de Cabeça (ALH), que foi maior nas amostras tratadas com mioinositol, em relação ao grupo controle (Tabela 1).

Tabela 1 - Médias $\pm$ erros padrão das características de motilidade, entre os tratamentos: mioinositol (MIO), ácido ferúlico (AF), melatonina (MEL) e controle (CON), avaliadas em sêmen equino refrigerado (8 horas)

VARIÁVEIS	TRATAMENTOS			
	MIO	AF	MEL	CON
MT (%)	78,45 $\pm$ 1,78	78,41 $\pm$ 1,45	78,00 $\pm$ 1,60	75,60 $\pm$ 1,94
MP (%)	35,52 $\pm$ 1,83	34,60 $\pm$ 1,73	33,72 $\pm$ 1,81	32,20 $\pm$ 1,97
VAP (μm/s)	123,68 $\pm$ 3,48	118,04 $\pm$ 3,45	122,77 $\pm$ 3,18	122,20 $\pm$ 3,65
VSL (μm/s)	82,95 $\pm$ 2,80	77,42 $\pm$ 2,43	80,80 $\pm$ 2,35	78,86 $\pm$ 2,53
VCL (μm/s)	236,93 $\pm$ 6,43	228,90 $\pm$ 6,46	235,55 $\pm$ 6,24	233,65 $\pm$ 6,71
ALH (μm/s)	8,34 $\pm$ 0,21 ^a	8,15 $\pm$ 0,20 ^{ab}	8,17 $\pm$ 0,20 ^{ab}	7,87 $\pm$ 0,20 ^b
BCF (Hz)	34,50 $\pm$ 0,64	34,37 $\pm$ 0,50	34,51 $\pm$ 0,54	34,95 $\pm$ 0,50
STR (%)	66,89 $\pm$ 0,89	66,97 $\pm$ 0,99	66,12 $\pm$ 0,98	64,72 $\pm$ 1,06
LIN (%)	36,63 $\pm$ 0,67	36,18 $\pm$ 0,65	36,41 $\pm$ 0,73	35,82 $\pm$ 0,64
RAP (%)	71,91 $\pm$ 2,28	71,89 $\pm$ 1,91	71,57 $\pm$ 1,99	70,25 $\pm$ 2,33

Letras diferentes dentro da mesma linha representam diferença estatística ($P < 0,05$).

MT: motilidade total; MP: motilidade progressiva; VAP: velocidade de trajeto; VSL: velocidade progressiva; VCL: velocidade curvilínea; ALH: amplitude lateral de cabeça; BCF: frequência de batimento flagelar; STR: retilinearidade; LIN: linearidade; RAP: porcentagem de espermatozoides rápidos.

FONTE: (AFFONSO, 2013).

Foi observado efeito de interação entre tempo e tratamento para a variável Velocidade de Trajeto (VAP; $P < 0,05$). No tempo 0 (T0), ou seja, sêmen *in natura*, não houve diferença entre os grupos, já após 4 horas de refrigeração (T4), a amostra tratada com ácido ferúlico (AF), apresentou menor valor em relação aos outros grupos. No entanto, com 8 horas de refrigeração (T8), os grupos não diferiram estatisticamente (Tabela 2).

As amostras tratadas com mioinositol e com melatonina não sofreram efeito do tempo para essa variável. No entanto, houve efeito no grupo tratado com ácido ferúlico, onde os valores observados nos tempos 0 e 8 (T0 e T8), diferiram estatisticamente dos valores observados com 4 horas de refrigeração (T4). Para o grupo controle, o valor de velocidade de

trajeto observado no T0 foi estatisticamente menor do que os do T4 e T8, que não diferiram estatisticamente (Tabela 2).

Tabela 2 - Médias $\pm$ erros padrão da Velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), entre os tratamentos: mioinositol (MIO), ácido ferúlico (AF), melatonina (MEL) e controle (CON); avaliada em sêmen equino, nos tempos 0, 4 e 8 horas de refrigeração

VAP ($\mu\text{m/s}$)				
TEMPOS	TRATAMENTOS			
	MIO	AF	MEL	CON
T0	122,74 $\pm$ 6,73	119,10 $\pm$ 6,71 ^{AB}	122,56 $\pm$ 7,79	113,14 $\pm$ 7,72 ^B
T4	125,97 $\pm$ 5,74 ^a	112,68 $\pm$ 5,86 ^{Bb}	120,88 $\pm$ 4,49 ^a	127,58 $\pm$ 5,00 ^{Aa}
T8	122,33 $\pm$ 5,92	122,62 $\pm$ 5,31 ^A	124,87 $\pm$ 3,76	125,87 $\pm$ 5,67 ^A

Letras minúsculas diferentes dentro da mesma linha representam diferença estatística ($P < 0,05$).

Letras maiúsculas diferentes dentro da mesma coluna representam diferença estatística ($P < 0,05$).

T0 – 5 minutos após a adição do diluidor (0 horas de refrigeração); T4 – 4 horas de refrigeração; T8 – 8 horas de refrigeração

FONTE: (AFFONSO, 2013).

3.3.2 Integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial

Com exceção da porcentagem de células com membrana plasmática intacta (MPI), todas as variáveis sofreram efeito dos tratamentos.

Tanto para a porcentagem de células com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e alto potencial de mitocôndria (PIAIA), quanto para a porcentagem de células com alto potencial de mitocôndria (APM), os grupos tratados com melatonina e ácido ferúlico apresentaram melhores resultados do que o grupo controle ($P < 0,01$; Tabela 3).

Já a porcentagem de células com acrossomo intacto (MAI) foi estatisticamente maior para o grupo tratado com melatonina, em relação aos outros grupos ($P < 0,05$; Tabela 3).

Não houve efeito de interação dos tempos com os tratamentos, para nenhuma das variáveis testadas.

Tabela 3 - Médias $\pm$ erros padrão da porcentagem das integridades das membranas, entre os tratamentos: mioinositol (MIO), ácido ferúlico (AF), melatonina (MEL) e controle (CON), avaliadas em sêmen equino refrigerado (8 horas)

VARIÁVEIS	TRATAMENTO			
	MIO	AF	MEL	CON
PIAIA	75,43 $\pm$ 2,03 ^{ab}	78,78 $\pm$ 1,66 ^a	78,07 $\pm$ 2,02 ^a	73,75 $\pm$ 2,01 ^b
MPI	79,86 $\pm$ 1,81	82,45 $\pm$ 1,50	81,38 $\pm$ 1,83	78,52 $\pm$ 1,57
APM	78,18 $\pm$ 1,93 ^{ab}	81,01 $\pm$ 1,50 ^a	80,11 $\pm$ 1,85 ^a	76,56 $\pm$ 1,99 ^b
MAI	99,41 $\pm$ 0,09 ^b	99,33 $\pm$ 0,09 ^b	99,69 $\pm$ 0,07 ^a	99,39 $\pm$ 0,09 ^b

Letras diferentes dentro da mesma linha representam diferença estatística ($P < 0,05$).

PIAIA: porcentagem de células com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e alto potencial de mitocôndria; MPI: porcentagem de células com membrana plasmática intacta; APM: porcentagem de células com alto potencial de mitocôndria; MAI: porcentagem de células com acrossomo intacto.

Fonte: (AFFONSO, 2013).

3.3.3 Quantidade de espécies reativas de oxigênio

A fluorescência emitida, relativa à quantidade de espécies reativas de oxigênio presentes na amostra não foi alterada pelos tratamentos, em nenhum dos tempos (Tabela 4).

Tabela 4 - Médias $\pm$ erros da padrão da fluorescência emitida, relativa a quantidade de espécies reativas de oxigênio, entre os tratamentos: mioinositol (MIO), ácido ferúlico (AF), melatonina (MEL) e controle (CON), avaliada em sêmen equino refrigerado (8 horas)

	TRATAMENTOS			
	MIO	AF	MEL	CON
UFR	53,82 $\pm$ 3,32	53,10 $\pm$ 2,37	58,29 $\pm$ 3,02	54,77 $\pm$ 2,24

UFR: Unidade de fluorescência relativa

Fonte: (AFFONSO, 2013).

3.4 DISCUSSÃO

A influência da adição de agentes antioxidantes na qualidade do sêmen equino refrigerado ao longo do tempo foi avaliada nesse trabalho.

A maioria dos parâmetros cinéticos não apresentou diferença estatística entre os tratamentos e entre o grupo controle e os grupos tratados. No entanto, as variáveis motilidade

total (MT), motilidade progressiva (MP), retilinearidade (STR), linearidade (LIN) e porcentagem de células rápidas (RAP) apresentaram valores numericamente menores no grupo controle em comparação com os grupos tratados. É possível que se o processo de refrigeração fosse mais longo (12, 24 ou 48 horas), seria observado efeito dos tratamentos sobre essas características de motilidade, uma vez que os efeitos deletérios da refrigeração são mais observados ao longo do tempo (RAPHAEL, 2007).

Foi observado um aumento na amplitude lateral de cabeça (ALH) no grupo tratado com mioinositol, quando comparado aos outros grupos. Isso pode ser explicado pelo fato do mioinositol ser precursor de dois importantes segundos mensageiros celulares: o diacilglicerol (DAG) e o inositol trifosfato (InsP3). O InsP3 é um importante ativador dos canais de cálcio, o que culmina com o aumento na concentração de Ca^{2+} intracelular (CONDORELLI et al., 2011). Esse aumento pode induzir a hiperativação espermática, que trata-se de uma mudança no padrão de motilidade e faz parte do processo de capacitação espermática (RATHI et al., 2001). A capacitação é um fenômeno que envolve eventos sequenciais e diversas mudanças fisiológicas, culminando com a reação acrossomal e ligação do espermatozoide à zona pelúcida (ANDRADE et al., 2012). Esse processo é caracterizado por um aumento na amplitude de batimento flagelar, que no sistema CASA pode ser detectado pelas variáveis ALH e VCL (RATHI et al., 2001). Essas características apresentadas não são desejáveis para o sêmen refrigerado, pois esses processos devem acontecer apenas no trato reprodutivo da fêmea e a ocorrência precoce levaria à redução da fertilidade. Entretanto, nas biotécnicas as quais é desejável que o processo de capacitação do espermatozoide ocorra fora do trato reprodutivo da fêmea (como a fertilização *in vitro*, em bovinos), a utilização do mioinositol pode ser uma metodologia interessante, pois o composto além de desencadear esse processo, atua como antioxidante e regulador da osmolaridade, podendo apresentar efeitos benéficos. Mais estudos são necessários para que essa hipótese seja aprofundada.

O choque frio pode lesionar espermatozoides em diferentes níveis estruturais, incluindo as membranas plasmáticas, acrossomais e mitocondriais, alterando a integridade funcional e assim, reduzindo a habilidade fertilizante (SUCCU et al., 2011). A melatonina e o ácido ferúlico foram capazes de preservar as membranas mitocondriais, aumentando a porcentagem de células intactas (membranas plasmáticas e acrossomais intactas, alto potencial de membrana mitocondrial) e de células com alto potencial de mitocôndria, isoladamente, em relação ao grupo controle, durante o processo de refrigeração.

Esse resultado é importante, uma vez que as mitocôndrias são as estruturas subcelulares dos espermatozoides mais sensíveis à refrigeração e congelamento e a perda de potencial

mitocondrial, pode acarretar em diminuição na geração de ATP e consequente, redução da motilidade (PEÑA et al., 2009; AITKEN et al., 2012).

A preservação das células com alto potencial de membrana mitocondrial causada pela melatonina também era esperada pelo fato de ser a mitocôndria, o seu principal alvo dentro da célula (JOU et al., 2007; MARTÍN-HIDALGO et al., 2011).

Outra explicação é a habilidade da melatonina em estimular a atividade das enzimas antioxidantes glutathiona peroxidase e glutathiona redutase (KARBOWNIK; REITER, 2000). A mitocôndria, por não conter catalase, é muito, se não inteiramente, dependente da glutathiona e suas enzimas e quando os níveis de enzima estão muito diminuídos, o peróxido de hidrogênio é acumulado e isso leva a um extensivo dano mitocondrial (MARTÍN et al., 2000).

Silva, da et al. (2011) também observaram aumento na porcentagem de células com mitocôndria ativa em espermatozoides equinos, incubados com melatonina por três horas a 37°C. A concentração de melatonina utilizada pelos pesquisadores foi a mesma do presente estudo (1µM).

Já foi relatada a presença de óxido nítrico em mitocôndrias de espermatozoides equinos (SILVA, da et al., 2011) e sabe-se que o peroxinitrito formado a partir da reação do oxigênio com o óxido nítrico é altamente citotóxico, sendo responsável por efeitos tóxicos diretos, como a peroxidação lipídica (NORDBERG; ARNÉR, 2001). Tanto a melatonina, quanto o ácido ferúlico são antioxidantes potentes, exercendo efeito inclusive sobre ERNs, como o peroxinitrito (PANNALA et al., 1998; CARPENTIERI et al., 2012). Essa pode ser uma das razões pelas quais os tratamentos com melatonina e ácido ferúlico exerceram efeito sobre o potencial de membrana mitocondrial e o mesmo não ocorreu com o mioinositol, uma vez que existem relatos de que o mioinositol também age sobre a mitocôndria, porém não se conhece a sua atuação contra ERNs (COLONE et al., 2010; CONDORELLI et al., 2011).

Concorelli et al. (2012) incubaram sêmen de homens férteis e subférteis com mioinositol e observaram melhora na função mitocondrial. No entanto, essa melhora ocorreu apenas no grupo dos subférteis, o que pode explicar a não observação desse efeito no presente estudo, uma vez que os animais utilizados apresentavam histórico normal de fertilidade.

A integridade acrossomal também é essencial à fertilidade do espermatozoide, pois um acrossomo intacto é necessário para que ocorra a reação acrossomal, fundamental à penetração do espermatozoide na zona pelúcida e à fusão com a membrana plasmática do oócito, eventos que precedem a fertilização (OURA; TOSHIMORI, 1990; THOMAS et al., 1997; FLESCH; GADELLA, 2000). O tratamento com melatonina foi capaz de preservar as membranas acrossomais durante o processo de refrigeração, observando-se nesse grupo,

maior porcentagem de células com membrana acrossomal intacta em relação aos outros tratamentos.

A sonda fluorescente DCFH-DA foi utilizada na mensuração das EROs. Apesar de alguns autores relatarem a especificidade da sonda por peróxido de hidrogênio (MAHFOUZ et al., 2010; MACÍAS-GARCÍA et al., 2012), ela pode ser oxidada também pelo radical peroxila. Já o óxido nítrico e o peroxinitrito necessitam de maiores concentrações, pois seu efeito oxidante sobre a sonda é mais fraco (WANG; JOSEPH, 1999).

Essa baixa especificidade por ERNs pode ser uma das razões para que não houvesse diferença estatística na quantidade de ERs produzida (representada pela fluorescência emitida) entre os tratamentos, durante a refrigeração. Essa hipótese é sustentada pelo trabalho de Du Plessis, Hagenaar e Lampiao (2010), que visando avaliar os efeitos do tratamento com melatonina no sêmen humano, utilizaram a sonda DCFH-DA, com o objetivo de avaliar apenas o efeito limpador da melatonina sobre as EROs e para avaliar o mesmo efeito sobre as ERNs, utilizou outra sonda fluorescente (DAF-2/DA). Após 120 minutos de incubação a 37°C, houve redução significativa nas ERNs no grupo tratado, em relação ao controle, porém não houve diferença entre os grupos nas EROs.

Poucos trabalhos realizaram a leitura da sonda DCFH-DA por fluorimetria, em espermatozoides (RUSSO et al., 2006; ABOUA et al., 2012). No entanto como em geral a fluorescência é expressa em unidades relativas ou arbitrárias, não é possível a comparação entre os valores absolutos obtidos. Assim, por se tratar de uma técnica muito pouco utilizada em espermatozoides e nunca utilizada em equinos, talvez necessite de mais testes para que ocorra o seu aprimoramento.

3.5 CONCLUSÃO

Apesar do aumento numérico, a adição de melatonina, mioinositol e ácido ferúlico ao diluidor utilizado na refrigeração do sêmen equino por até 8 horas não melhora as características de motilidade (CASA) e não altera a quantidade de EROs. No entanto, a adição de melatonina e ácido ferúlico ao diluidor utilizado na refrigeração do sêmen equino por até 8 horas aumenta a porcentagem de membranas íntegras (membranas plasmática e acrossomal íntegras, alto potencial de mitocôndria). Com isso, sugere-se que o suplemento do diluidor

com essas substâncias pode aumentar a longevidade e a viabilidade dos espermatozoides equinos em até 8 horas de refrigeração.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A refrigeração do sêmen é uma biotécnica marcadamente importante na reprodução equina. Em vista do dano causado à célula espermática pelo excesso de EROs e ERNs, denotando o estresse oxidativo, torna-se fundamental a utilização de compostos que possam amenizar esse prejuízo.

Pensando nisso, os resultados positivos observados no presente trabalho quando os antioxidantes melatonina e ácido ferúlico foram adicionados ao diluidor utilizado na refrigeração do sêmen equino por 8 horas, são de extrema importância, pois abrem novas portas à busca de melhor qualidade espermática após o processo de refrigeração.

Apesar da quantificação de EROs não ter sido afetada pelos tratamentos, vale ressaltar o início do desenvolvimento de uma nova técnica, que trata-se da utilização da sonda fluorescente DCFH-DA, com o auxílio do fluorímetro, em espermatozoides equinos. Por se tratar de uma técnica relativamente simples, precisa e rápida, é interessante que novos testes sejam realizados visando o seu aprimoramento, para que assim, a mensuração de EROs e ERNs possa ser incorporada à rotina laboratorial de análise do sêmen equino, e quiçá à rotina do campo.

REFERÊNCIAS

ABOUA, Y. G.; BROOKS, N.; MAHFOUZ, R. Z.; AGARWAL, A.; DU PLESSIS, S.S. A red palm oil diet can reduce the effects of oxidative stress on rat spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 44, p. 32-40, 2012.

AITKEN, R. J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 7, n. 4, p. 659-668, 1995.

AITKEN, R. J.; BAKER, M. Oxidative stress and male reproductive biology. **Reproduction, Fertility and development**, v.16, n. 5, p. 581-588, 2004.

AITKEN, R.J.; CLARKSON, J. S.; FISHEL, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. **Biology of Reproduction**, v. 41, n. 1, p. 183-197, 1989.

AITKEN, R. J.; IULIIS, G. N. de; GIBB, Z.; BAKER, M. A. The simmet lecture: new horizons on an old landscape – oxidative stress, DNA damage and apoptosis in the male germ line. In: 17th International Congress on Animal Reproduction - ICAR, 2012, Vancouver / Canadá. **Reproductive in Domestic Animals**, v. 47, p. 7-14, 2012.

ALLEGRA, M.; REITER, R. J.; TAN, D. X.; GENTILE, C.; TESORIERE, L.; LIVREA, M. A. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. **Journal of Pineal Research**, v. 34, p. 1-10, 2003.

ALMEIDA, F. Q. D.; SILVA, V. P. Progresso científico em equideocultura na 1^a década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 119-129, 2010. Suplemento especial.

ALMEIDA, M. V. de; SILVA, A. D. da; SOUZA, M. V. N. de; BENÍCIO, A. A. A. A cascata dos fosfoinosítídeos. **Revista Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 105-111, 2003.

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.

ANDRADE, A. F. C. de; ZAFFALON, F. G.; NASCIMENTO, J.; MARTINS, S. M. M. K.; ARRUDA, R. P.; BRESSAN, F. F. Post-thaw addition of seminal plasma reduces tyrosine phosphorylation on the surface of cryopreserved equine sperm, but does not reduce lipid peroxidation. **Theriogenology**, v. 77, n. 9, p. 1866-72, 2012.

ANDRADE, E. R.; MELO-STERZA, F. A.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 2, p. 79-85, 2010.

ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 2000. 121 f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; CELEGHINI, E. C. C.; RAPHAEL, C. F.; ZAFFALON, F. G.; MARTINS, S. M. M. K.; NASCIMENTO, J.; ALONSO, M. A.; MEJIA, A. Manipulação e uso do sêmen transportado refrigerado de garanhões. In: SIMPÓSIO DE EQUÍDEOCULTURA - SIMEQ, 2., 2009, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2009. p. 111-131.

ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; PERES, K. R.; RAPHAEL, C. F.; NASCIMENTO, J.; CELEGHINI, E. C. C. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 1, p. 8-16, 2007.

ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ALONSO, M. A.; CARVALHO, H. F.; OLIVEIRA, L. Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D. F.; AFFONSO, F. J.; LEMES, K. M.; JAIMES, J. D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática : momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 19, p. 145-151, 2011.

ARRUDA, R. P.; SILVA, D. F.; ALONSO, M. A.; ANDRADE, A. F. C. de; NASCIMENTO, J.; GALLEGOS, A. M.; MARTINS, S. M. M. K.; GRANATO, T. M. Nutraceuticals in reproduction of bulls and stallions. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 393-400, 2010.

ASHRAFI, I.; KOHRAM, H.; ARDABILI, F. F. Antioxidative effects of melatonin on kinetics, microscopic and oxidative parameters of cryopreserved bull spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 129, n.1-4, p.25-30, 2013.

AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n. 1-4, p. 65-75, 2005.

AURICH, C. Recent advances in cooled-sêmen technology. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3-4, p. 268-75, 2008.

AURICH, J. E.; SCHÖNHERR, U.; HOPPE, H.; AURICH, C. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion sêmen. **Theriogenology**, v. 48, p. 185-192, 1997.

AZIZ, N.; NOVOTNY, J.; OBORNA, I.; FINGEROVA, H.; BREZINOVA, J.; SVOBODOVA, M. Comparison of chemiluminescence and flow cytometry in the estimation of reactive oxygen and nitrogen species in human sêmen. **Fertility And Sterility**, v. 94, p. 2604-2608, n. 7, 2010.

BALL, B. A. The effect of oxidative stress on equine sperm function, sêmen storage and stallion fertility. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 20, n. 2, p. 95-96, 2000.

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

BALL, B. A.; MEDINA, V.; GRAVANCE, C. G.; BAUMBER, J. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. **Theriogenology**, v. 56, p. 577-589, 2001.

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

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

BAUMBER, J.; VO, A. T.; SABEUR, K.; BALL, B. A. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 57, n. 3, p. 1025-1033, 2002.

BAYDAS, G.; CANATAN, H.; TURKOGLU, A. Comparative analysis of the protective effects of melatonin and vitamin E on streptozocin-induced diabetes mellitus. **Journal of Pineal Research**, v. 32, p. 225-230, 2002.

BEDFORD-GUAUS, S. J. Transported stallion sêmen and breeding mares with cooled or frozen-thawed sêmen. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 6, n. 4, p. 239-248, 2007.

BEEEMSTER, P.; GROENEN, P.; STEEGERS-THEUNISSEN, R. Involvement of inositol in reproduction. **Nutrition Reviews**, v. 60, n. 3, p. 80-87, 2002.

BORNMAN, M. S.; OOSTHUIZEN, J. M.; BARNARD, H. C.; SCHULENBURG, G. W.; BOOMKER, D.; REIF, S. Melatonin and sperm motility. **Andrologia**, v. 21, p. 483–485, 1989.

BRINSKO, S. P.; ROWAN, K. R.; VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L. Effects of transport container and ambient storage temperature on motion characteristics of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 53, p. 1641–1655, 1999.

BROUWERS, J. F. H. M.; GADELLA, B. M. In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 35, p. 1382-1391, 2003.

BUCAK, M. N.; ATESSAHIN, A.; YÜCE, A. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram sêmen after the freeze–thawing process. **Small Ruminant Research**, v. 75, n. 2-3, p. 128-134, 2008.

BUCAK, M. N.; TUNCER, P. B.; SARIOZKAN, S.; BASPINAR, N.; TASPINAR, M.; ÇOYAN, K.; BILGILI, A.; AKALIN, P. P.; BÜYÜKLEBLEBICI, S.; AYDOS, S.; ILGAZ, S.; SUNGUROGLU, A.; ÖZTUNA, D. Effects of antioxidants on post-thawed bovine sperm and oxidative stress parameters: antioxidants protect DNA integrity against cryodamage. **Cryobiology**, v. 61, n. 3, p. 248-253, 2010.

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.

BURNAUGH, L.; SABEUR, K.; BALL, B. A. Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium. **American Journal of Veterinary Research**, v. 67, n. 3, p. 701-706, 2006.

CANISSO, I. F.; SOUZA, F. A.; SILVA, E. C.; CARVALHO, G. R.; GUIMARÃES, J. D.; LIMA, A. L. Inseminação artificial em equinos : sêmen fresco, diluído, resfriado e transportado. **Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 6, n. 3, p. 389-398, 2008.

CARPENTIERI, A.; BARBOZA, D.; ARECOA, V.; LÓPEZ, M. P.; TALAMONI, N. T. New perspectives in melatonin uses. **Pharmacological Research**, v. 65, n. 4, p. 437-444, 2012.

CASAO, A.; MENDOZA, N.; PÉREZ PE, R.; GRASA, P.; ABECIA, J.; FORCADA, F.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; MUINO-BLANCO, T. Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility rate. **Journal of Pineal Research**, v. 48, n. 1, p. 39-46, 2010.

CNA. CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL. Produção da pecuária municipal. Brasília: IBGE, 2011. Disponível em: <www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2011/default.shtm> Acesso em: 27 jun. 2013.

CELEGHINI, E. C. C.; ANDRADE, A. F. C. de; RAPHAEL, C. F.; NASCIMENTO, J.; TICIANELLI, J. S.; ARRUDA, R. P. Damage assessment of the equine sperm membranes by fluorimetric technique. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 1285–1292, 2010a.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C. de; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 5, p. , 2007.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C. de; RAPHAEL, C. F.; NASCIMENTO, J. Simultaneous evaluation of the plasmatic, acrosomal and mitochondrial membranes in equine spermatozoa. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 15., 2004, Porto Seguro. **Abstract...** Belo Horizonte: CBRA, 2004. p. 511.

CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P. Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 536-543, 2010b.

CHOTIMARKORN, C.; USHIO, H. The effect of trans-ferulic acid and gamma-oryzanol on ethanol-induced liver injury in C57BL mouse. **Phytomedicine**, v. 15, n. 11, p. 951-958, 2008.

CLAUSTRAT, B.; BRUN, J.; CHAZOT, G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. **Sleep Medicine Reviews**, v. 9, p. 11-24, 2005.

COLONE, M.; MARELLI, G.; UNFER, V.; BOZZUTO, G.; MOLINARI, A.; STRINGARO, A. Inositol activity in oligoasthenoteratospermia-an in vitro study. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 14, n. 10, p. 891-896, 2010.

CONDORELLI, R. A.; LA VIGNERA, S.; DI BARI, F.; UNFER, V.; CALOGERO, A. E. Effects of myoinositol on sperm mitochondrial function in-vitro. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 15, n. 2, p. 129-134, 2011.

CONDORELLI, R. A.; LA VIGNERA, S.; BELLANCA, S.; VICARI, E.; CALOGERO, A. E. Myoinositol: does it improve sperm mitochondrial function and sperm motility? **Urology**, v. 79, n. 6, p. 1290-1295, 2012.

DOUGLAS-HAMILTON, D. H.; OSOL, R.; OSOL, G.; DRISCOLL, D.; NOBLE, H. A field study of fertility of transported equine sêmen. **Theriogenology**, v. 22, n. 3, p. 291-304, 1984.

DOWSETT, K. F.; KNOTT, L. M.; The influence of age and breed on stallion sêmen. **Theriogenology**, v. 46, p. 397-412, 1996.

DU PLESSIS, S. S.; HAGENAAR, K.; LAMPIAO, F. The in vitro effects of melatonin on human sperm function and its scavenging activities on NO and ROS. **Andrologia**, v. 42, p. 112-116, 2010.

FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1469, n. 3, p. 197-235, 2000.

FORD, W. C.; WHITTINGTON, K.; WILLIAMS, A.C. Reactive oxygen species in human sperm suspensions: production by leukocytes and the generation of NADPH to protect sperm against their effects. **International Journal of Andrology**, v. 20, n. 3, p. 44-49, 1997.

FUJINOKI, M. Melatonin-enhanced hyperactivation of hamster sperm. **Reproduction**, v. 136, n. 5, p. 533-541, 2008.

FUNAHASHI, H.; SANO, T. Select antioxidants improve the function of extended boar sêmen stored at 10°C. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1605-1616, 2005.

FÜRST, J.; GSCHWENTNER, M.; RITTER, M.; BOTTÀ, G.; JAKAB, M.; GARAVAGLIA, L.; BAZZINI, C.; RODIGHIERO, S.; MEYER, G.; EICHMÜLLER, S.; WÖLL, E.; PAULMICHL, M. Molecular and functional aspects of anionic channels activated during regulatory volume decrease in mammalian cells. **Pflügers Archiv : European Journal of Physiology**, v. 444, n. 1-2, p. 1-25, 2002.

GARNER, D. L.; JOHNSON, L. A. Viability assessment of mamalian sperm using SYBR-14 and Propidium iodide. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 276-284, 1995.

GARNER, D. L.; THOMAS, C. A.; GRAVANCE, C. G. The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. **Reproduction of Domestic Animal**, v. 34, p. 399-404, 1999.

GAVELLA, M.; LIPOVAC, V. Antioxidative effect of melatonin on human spermatozoa. **Archives of Andrology**, v. 44, p. 23-27, 2000.

GEORGIEV, G.; DIMITROV, R.; TODOROV, P.; DIMITROV, Y.; KONAKCHIEVA, R. Melatonin receptors in human spermatozoa - new findings and relevance to assisted reproduction. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 94, n. 1, p. 105, 2012.

GHARAGOZLOO, P.; AITKEN, R. J. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. **Human Reproduction**, v. 26, n. 7, p. 1628-1640, 2011.

GRAF, E. Antioxidant potential of ferulic acid. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 13, p. 435-448, 1992.

GRAVANCE, C. G.; GARNER, D. L.; BAUMBER, J.; BALL, B. A. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. **Theriogenology**, v. 53, p. 1691-1703, 2000.

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

GULTEKIN, F.; DELIBAS, N.; YASAR, S.; KILINC, I. In vivo changes in antioxidant systems and protective role of melatonin and a combination of vitamin C and vitamin E on oxidative damage in erythrocytes induced by chlorpyrifos-ethyl in rats. **Archives of Toxicology**, v. 75, p. 88-96, 2001.

GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R. Effects of reactive oxygen species on sperm function. **Theriogenology**, v. 78, p. 1700-1708, 2012.

HECKENBICHLER, S.; DEICHSEL, K.; PETERS, P.; AURICH, C. Quality and fertility of cooled-shipped stallion semen at the time of insemination. **Theriogenology**, v. 75, n. 5, p. 849-856, 2011.

HUANG, M.; SMART, R. C.; WONG, C.; CONNEY, A. H. Inhibitory Effect of curcumin, chlorogenic acid, caffeic acid, and ferulic acid on tumor promotion in mouse skin by 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Cancer Research**, v. 48, p. 5941-5946, 1988.

HSU, C.; HAN, B.; LIU, M.; YEH, C.; CASIDA, J. E. Phosphine-induced oxidative damage in rats: attenuation by melatonin. **Free Radic Biology & Medicine**, v. 28, n. 4, p. 636-642, 2000.

IANAS, O.; OLNESECU, R.; BADESCU, I. Melatonin involvement in oxidative stress. **Romanian Journal of Endocrinology**, v. 29, p. 147-153, 1991.

IMADA, K.; HIROSE, M.; YAMAGUCHI, S.; TAKAHASHI, S.; ITO, N. Effects of naturally occurring antioxidants on combined 1,2- dimethylhydrazine-initiated and l-methyl-l-nitrosourea-initiated carcinogenesis in F344 rats. **Cancer Letters**, v. 55, p. 53-60, 1990.

IRVINE, D. S. Glutathione as a treatment for male infertility. **Reviews of Reproduction**, v. 1, p. 6-12, 1996.

ITAGAKI, S.; KUROKAWA, T.; NAKATA, C.; SAITO, Y.; OIKAWA, S.; KOBAYASHI, M.; HIRANO, T.; ISEKI, K. In vitro and in vivo antioxidant properties of ferulic acid: a comparative study with other natural oxidation inhibitors. **Food Chemistry**, v. 114, n. 2, p. 466-471, 2009.

IULIIS, G. N.; THOMSON, L. K.; MITCHELL, L. A.; FINNIE, J. M.; KOPPERS, A. J.; HEDGES, A.; NIXON, B.; AITKEN, R. J. DNA damage in human spermatozoa is highly correlated with the efficiency of chromatin remodeling and the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 3, p. 517-524, 2009.

JANG, H. Y.; KIM, Y. H.; KIM, B. W.; PARK, I. C.; CHEONG, H. T.; KIM, J. T.; PARK, C. K.; KONG, H. S.; LEE, H. K.; YANG, B. K. Ameliorative effects of melatonin against

hydrogen peroxide-induced oxidative stress on boar sperm characteristics and subsequent in vitro embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 6, p. 943-950, 2010.

JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation of field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. **Theriogenology**, v. 55, p. 947-981, 2001.

JFCRF. THE JAPAN FOOD CHEMICAL RESEARCH FOUNDATION. 1996. Existing list of items list additives — the 56th Issue of Japanese's Life and Health Ministry Director General Notification “health food additives based on the law and displayed”. 1996. Disponível em: <[http://www. ffcr.or.jp/1996last](http://www.ffcr.or.jp/1996last)>. Acesso em: 08 jun.2013

JOU, M.-J.; PENG, T.-I.; YU, P.-Z.; JOU, S.-B.; REITER, R. J.; CHEN, J.-Y.; WU, H.-Y.; CHEN, C.-C.; HSU, L.-F. Melatonin protects against common deletion of mitochondrial DNA-augmented mitochondrial oxidative stress and apoptosis. **Journal of Pineal Research**, v. 43, n. 4, p. 389-403, 2007.

KANE, M. T.; NORRIS, M.; HARRISON, R. Uptake and incorporation of inositol by preimplantation mouse embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 96, p. 617-625, 1992.

KANSKI, J.; AKSENOVA, M.; STOYANOVA, A.; BUTTERFIELD, D. A. Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems in vitro: structure-activity studies. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 273-281, 2002.

KARBOWNIK, M.; REITER, R. J. Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 225, p. 9-22, 2000.

KATILA, T. Procedures for handling fresh stallion semen. **Theriogenology**, v. 48, p. 1217-1227, 1997.

KENNEY, R. M.; BERGMAN, R. V.; COOPER, W. L.; MORSE, G. W. Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. In: **ANNUAL CONVENTION AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTICES**, 21., 1975, falta localização de realização do evento. **Proceedings...** Boston: AAEP, 1975. p. 327–336.

KIRSCHVINK, N.; MOFFARTS, B.; LEKEUX, P. The oxidant/antioxidant equilibrium in horses. **Veterinary Journal**, v. 177, p. 178-191, 2008.

KOH, P. O. Ferulic acid prevents the cerebral ischemic injury-induced decrease of Akt and Bad phosphorylation. **Neuroscience Letters**, v. 507, p. 156-160, 2012.

KORKMAZ, A.; REITER, R. J.; TOPAL, T.; MANCHESTER, L. C.; OTER, S.; TAN, D. X. Melatonin: an established antioxidant worthy of use in clinical trials. **Molecular Medicine**, v. 15, n. 1-2, p. 43-50, 2009.

LA FALCI, V. S.; YRJÖ-KOSKINEN, A. E.; FAZELI, A.; HOLT, W. V.; WATSON, P. F. Antioxidant combination are no more beneficial than individual components in combating ram sperm oxidative stress during storage at 5°C. **Animal Reproduction Science**, v. 129, n. 3-4, p. 180-187, 2011.

LANZAFAME, F. M.; LA VIGNERA, S.; VICARI, E.; CALOGERO, A. E. Oxidative stress and medical antioxidant treatment in male infertility. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 19, n. 5, p. 638-659, 2009.

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

LI, Z.; QIONGLIN L.; RONGJU L.; WANFEN X.; WANMIN L. Protective effects of ascorbate and catalase on human spermatozoa during cryopreservation. **Journal of Andrology**, v. 31, n. 5, p. 437-444, 2010.

LOOMIS, P. R. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. **The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice**, v. 22, p. 663-676, 2006.

LÓPEZ, A.; ESCAMES, J. A. G. G.; VENEGAS, C.; ORTIZ, F.; LÓPEZ, L. C.; ACUNA-CASTROVIEJO, D. Melatonin protects the mitochondria from oxidative damage reducing oxygen consumption, membrane potential, and superoxide anion production. **Journal of Pineal Research**, v. 46, p. 188-198, 2009.

LOVE, C. C. Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions. **Theriogenology**, v. 76, n. 3, p. 547-557, 2011.

MACÍAS-GARCÍA, B.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, L.; GALLARDO-BOLANOS, J. M.; PEÑA, F. J.; JOHANNISSON, A.; MORRELL, J. M. Androcoll-E large selects a subset of live stallion spermatozoa capable of producing ROS. **Animal Reproduction Science**, v. 132, p. 74-82, 2012.

MAHFOUZ, R. Z.; PLESSIS, S. S.; AZIZ, N.; SHARMA, R.; SABANEH, E.; AGARWAL, A. Sperm viability, apoptosis, and intracellular reactive oxygen species levels in human spermatozoa before and after induction of oxidative stress. **Fertility and Sterility**, v. 93, n. 3, p. 814-821, 2010.

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

MANN, T. **The biochemistry of sêmen**. London: Methuen & Co., 1954.

MARQUES, A.; ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C. ; GOBESSO, A. A. O.; NEVES NETO, J. R. Effects of ascorbic acid and pentoxifylline on equine cryopreserved sêmen submitted to in vitro incubation. **Theriogenology**, v. 58, p. 257-260, 2002.

MARTÍN, M.; MACIAS, M.; ESCAMES, G.; LEON, J.; ACUNA-CASTROVIEJO, D. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. **FASEB Journal**, v. 14, p. 1677-1679, 2000.

MARTÍN-HIDALGO, D.; BARÓN, F. J.; BRAGADOA, M. J.; CARMONA, P.; ROBINA, A.; GARCÍA-MARÍNA, L. J.; GIL, M. C. The effect of melatonin on the quality of extended boar semen after long-term storage at 17 °C. **Theriogenology**, v. 75, p. 1550-1560, 2011.

MCNAUGHT, A. D.; WILKINSON, E. **IUPAC: compendium of chemical terminology**. 2. ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1997. Disponível em: <<http://goldbook.iupac.org>>. Acesso em: 08 jun. 2013

MINERVINI, F.; LACALANDRA, G. M.; FILANNINO, A.; GARBETTA, A.; NICASSIO, M.; DELL'AQUILA, M. E.; VISCONTI, A. Toxic effects induced by mycotoxin fumonisin B1 on equine spermatozoa: assessment of viability, sperm chromatin structure stability, ROS production and motility. **Toxicology in Vitro**, v. 24, p. 2072-2078, 2010.

MORAN, D. M.; JASKO, D. J.; SQUIRES, E. L.; AMANN, R. P. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 38, n. 6, p. 999-1012, 1992.

NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; ANDRADE, A. F. C de; ALONSO, M. A.; CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P. Effects of sperm concentration and straw volume on motion characteristics and plasma, acrosomal, and mitochondrial membranes of equine cryopreserved spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, n. 6, p. 351-358, 2008.

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

NUNES, D. B.; ZORZATTO J. R.; COSTA E SILVA, E. V.; ZÚCCARI, C. E. S. N. Efficiency of short-term storage of equine semen in a simple-design cooling system. **Animal Reproduction Science**, v. 104, n. 4, p. 434-439, 2008.

ORTEGA-FERRUSOLA, C.; JOHANNISSON, A.; PEÑA, F. J.; TAPIA, J. A.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; DALIN, A. M.; MORRELL, J. M. Effect of different extenders and seminal plasma on the susceptibility of equine spermatozoa to lipid peroxidation after single-layer centrifugation, through Androcoll-E. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 31, p. 411-416, 2011.

ORTIZ, A.; ESPINO, J.; BEJARANO, I.; LOZANO, G. M.; MONLLOR, F.; GARCIA, J. F.; PARIENTE, J. A.; RODRÍGUEZ, A. B. High endogenous melatonin concentrations enhance sperm quality and short-term in vitro exposure to melatonin improves aspects of sperm motility. **Journal of Pineal Research**, v. 50, p. 132-139, 2011.

OURA C.; TOSHIMORI K. Ultrastructural studies on the fertilization of mammalian gametes. **International Review of Cytology**, v. 122, p. 105-151, 1990.

PANNALA, A.; RAZAQ, R.; HALLIWELL, B.; SINGH, S.; RICE-EVANS, C. A. Inhibition of peroxynitrite dependent tyrosine nitration by hydroxycinnamates: nitration or electron donation? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 24, n. 4, p. 594-606, 1998.

PAPA, F. O.; MELO, C. M.; DELL'AQUA, J. A.; MACEDO, L. P.; CARVALHO, A. G.; ALVARENGA, M. A.; MEDEIROS, A. S. L. Inovações metodológicas na biotecnologia de refrigeração e congelamento de sêmen equino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 19-27, 2005.

PAPALEO, E.; UNFER, F.; BAILLARGEON, J. P.; CHIU, T. T. Contribution of myo-inositol to reproduction. **European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology**, v. 147, p. 120-123, 2009.

PEÑA, F. J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 85-98, 2003.

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

QUINTERO-MORENO, A.; MIRÓ, J.; RIGAU, A. T.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E. Identification of sperm subpopulations with specific motility characteristics in stallion ejaculates. **Theriogenology**, v. 59, p. 1973-1990, 2003.

RAO, M. V.; GANGADHARAN, B. Antioxidative potential of melatonin against mercury induced intoxication in spermatozoa in vitro. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p. 935-942, 2008.

RAPHAEL, C. F. **Efeitos da centrifugação nas características de movimento, integridade e peroxidação lipídica das membranas do espermatozoide eqüino refrigerado**. 2007. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

RATHI, R.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M.; GADELLA, B. M. Evaluation of in vitro capacitation of stallion spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 2, p. 462-470, 2001.

REITER, R. J. Melatonin: lowering the high price of free radicals. **Physiology**, v. 15, p. 246-250, 2000.

REITER, R. J.; TAN, D. X.; OSUNA, C.; GITTO, E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress – a review. **Journal of Biomedical Science**, v. 7, p. 444–458, 2000.

RODRIGUEZ, C.; MAYO, J. C.; SAINZ, R. M.; ANTOLÍN, I.; HERRERA, F.; MARTÍN, V.; REITER, R. J. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. **Journal of Pineal Research**, v. 36, p. 1-9, 2004.

RUSSO, A.; TRONCOSO, N.; SANCHEZ, F.; GARBARINO, J. A.; VANELLA, A. Propolis protects human spermatozoa from DNA damage caused by benzo[a]pyrene and exogenous reactive oxygen species. **Life Sciences**, v. 78, p. 1401-1406, 2006.

SARABIA, L.; MAURER, I.; BUSTOS-OBREGÓN, E. Melatonin prevents damage elicited by the organophosphorous pesticide diazinon on mouse sperm DNA. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 663-668, 2009.

SEMERCIOZ, A.; ONUR, R.; OGRAS, S.; ORHAN, I. Effects of melatonin on testicular tissue nitric oxide level and antioxidant enzyme activities in experimentally induced left varicocele. **Neuroendocrinology Letters**, v. 24, p. 86–90, 2003.

SHANTHAKUMAR, J.; KARTHIKEYAN, A.; BANDUGULA, V. R.; PRASAD, N. R. Ferulic acid, a dietary phenolic acid, modulates radiation effects in Swiss albino mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 691, n. 1-3, p. 268-274, 2012.

SHARMA, O. P. Antioxidant activity of curcumin and related compounds. **Biochemical Pharmacology**, v. 25, p. 1811-1812, 1976.

SIEME, H. **Sêmen evaluation**. In: SAMPER, J. C. (Ed.). **Equine breeding management and artificial insemination**. 2. ed. Missouri: Saunders Elsevier, 2009. p. 57-74.

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

SILVA FILHO, J. M.; FONSECA, F. A.; PALHARES, M. S.; WANDERLEY, A. T.; OLIVEIRA, H. N. Avaliação de uma técnica de diluição e transporte de sêmen equino, para as condições brasileiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 27, n. 1, p. 66-74, 1998.

SOÑMEZ, M.; YUCE, A.; TURK, G. The protective effects of melatonin and vitamin E on antioxidant enzyme activities and epididymal sperm characteristics of homocysteine treated male rats. **Reproductive Toxicology**, v. 23, p. 226-231, 2007.

SUCCU, S.; BERLINGUER, F.; PASCIU, V.; SATTA, V.; LEONI, G. G.; NAITANA, S. Melatonin protects ram spermatozoa from cryopreservation injuries in a dose-dependent manner. **Journal of Pineal Research**, v. 50, p. 310-318, 2011.

SUDHEER, A. R.; MUTHUKUMARAN, S.; KALPANA, C.; SRINIVASAN, M.; MENON, V. P. Protective effect of ferulic acid on nicotine-induced DNA damage and cellular changes in cultured rat peripheral blood lymphocytes: a comparison with N-acetylcysteine. **Toxicology in Vitro**, v. 21, p. 576-585, 2007.

TAN, D. X.; CHEN, D. X.; POEGGELER, B.; MANCHESTER, L. C.; REITER, R. J. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. **Endocrinology**, v. 1, p. 57-60, 1993.

TAN, D.-X.; MANCHESTER, L. C.; TERRON, M. P.; FLORES, L. J.; REITER, R. J. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? **Journal of Pineal Research**, v. 42, n. 1, p. 28-42, 2007.

TARTAGLIONE, C. M.; RITTA, M. N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull sêmen. **Theriogenology**, v. 62, p. 1245-1252, 2004.

THOMAS, C.; GARNER, D. L.; DeJARNETTE, M.; MARSHALL, C. E. Fluorometric assessments of acrosomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 991-998, 1997.

TUNCER, P. B.; BUCAK, M. N.; BÜYÜKLEBLEBICI, S.; SARIÖZKAN, S.; YENİ, D.; EKEN, A.; AKALIN, P. P.; KINET, H.; AVDATEK, F.; FIDAN, A. F.; GÜNDOĞAN, M. The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull sêmen. **Cryobiology**, v. 61, p. 303-307, 2010.

URBANIĄK, A.; SZELA, M.; MOLSKI, M. Theoretical investigation of stereochemistry and solvent influence on antioxidant activity of ferulic acid. **Computational and Theoretical Chemistry**, v. 1012, p. 33-40, 2013.

VALLORANI, C.; SPINACI, M.; BUCCI, D.; TAMANINI, C.; GALEATI, G. Effects of antioxidants on boar spermatozoa during sorting and storage. **Animal Reproduction Science**, v. 122, p. 58-65, 2010.

VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L.; LOVE, C. L.; GARCIA, M. C.; KENNEY, R. M. Effects of sêmen fractionation and dilution ratio on equine spermatozoal motility parameters. **Theriogenology**, v. 28, p. 709-718, 1987.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted sêmen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149-179, 2002.

VIDAMENT, M.; MAGISTRINI, M.; LE FOLL, Y.; LEVILLAIN, N.; YVON, J-M.; DUCHAMP, G.; BLESBOIS, E. Temperatures from 4 to 15 °C are suitable for preserving the fertilizing capacity of stallion sêmen stored for 22 h or more in INRA96 extender. **Theriogenology**, v. 78, p. 297-307, 2012.

VAN VUUREN, R. J.; PITOUT, M. J.; VAN ASWEGEN, C. H.; THERON, J. J. Putative melatonin receptor in human spermatozoa. **Clinical Biochemistry**, v. 25, p. 125-127, 1992.

WANG, H.; JOSEPH, J. A. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 27, n. 5-6, p. 612-616, 1999.

YEUNG, C. H.; ANAPOLSKI, M.; SETIAWAN, I.; LANG, F.; COOPER, T. G. Effects of putative epididymal osmolytes on sperm volume regulation of fertile and infertile c-ros transgenic mice. **Journal of Andrology**, v. 25, p. 216-223, 2004.

ZHENG, R. L.; ZHANG, H. Effects of ferulic acid on fertile and asthenozoospermic infertile human sperm motility, viability, lipid peroxidation, and cyclic nucleotides. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 22, p. 581-586, 1997.