

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AÇÃO DA COENZIMA Q10 SOBRE A VIABILIDADE
ESPERMÁTICA DE GARANHÕES RESISTENTES OU SENSÍVEIS
À CONGELAÇÃO**

JOÃO ALEXANDRE MATOS CARNEIRO

BOTUCATU – SP
Julho 2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AÇÃO DA COENZIMA Q10 SOBRE A VIABILIDADE
ESPERMÁTICA DE GARANHÕES RESISTENTES OU SENSÍVEIS
À CONGELAÇÃO**

JOÃO ALEXANDRE MATOS CARNEIRO

Tese apresentada a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor no programa de pós-graduação em Biotecnologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. José Antonio
Dell’Aqua Junior

BOTUCATU – SP
Julho 2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Carneiro, João Alexandre Matos.

Ação da coenzima Q10 sobre a viabilidade espermática de
ganhões resistentes ou sensíveis à congelação / João
Alexandre Matos Carneiro. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia

Orientador: José Antonio Dell'Aqua Junior
Capes: 50504002

1. Equino - Reprodução. 2. Sêmen - Criopreservação.
3. Antioxidantes. 4. Coenzimas.

Palavras-chave: Antioxidante; Criopreservação; Equino;
Sêmen.

Nome do autor: João Alexandre Matos Carneiro

Título AÇÃO DA COENZIMA Q10 SOBRE A VIABILIDADE
ESPERMÁTICA DE GARANHÕES RESISTENTES OU SENSÍVEIS À
CONGELAÇÃO

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Antonio Dell'Aqua Junior

Presidente e orientador

Depart. de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ-UNESP-Botucatu /SP

Prof. Dr. Marco Antonio Alvarenga

Membro

Depart. de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ-UNESP-Botucatu /SP

Prof.^a Dr.^a Fabiana Ferreira de Souza

Membro

Depart. de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ-UNESP-Botucatu /SP

Prof.^a Dr.^a Priscila Nascimento Guasti

Membro

Departamento de Medicina Veterinária da Faculdade Max Planck

Dr. Marcio Teoro do Carmo

Membro

Médico Veterinário Autônomo

Data da defesa: 18 de julho de 2017.

*Dedico esta tese aos meus pais, **José Almeida e Margarida Matos**, que com muito amor e carinho, fazem de mim uma pessoa melhor. Meus irmãos, familiares e amigos pelo apoio em todos os momentos da minha vida.*

*Ao meu orientador, **José Antonio Dell’Aqua Junior**, pela confiança em minha capacidade, além da paciência e incentivo a realização desta obra.*

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por ter me ofertado a chance de alcançar o que escolhi ser, acima de tudo e por todas as maravilhas que Ele tem feito em minha vida.

*Aos meus pais, **José Almeida e Margarida Luiza**, por todo amor incondicional, carinho, respeito, confiança e admiração que sempre demonstraram por mim. Por terem me apoiado e por muitas vezes se sacrificado para me dar tudo o que precisei. Amo vocês!*

*Aos meus irmãos **Danilo Miguel e José Arthur**, a cunhada Paula Borges, pelo apoio emocional ao longo desses anos. Muito obrigado pelo carinho, sempre me ajudando na superação das dificuldades.*

*Aos meus sobrinhos **Malu, Miguel e Yasmin** por me fazerem muito feliz, me agraciando com amor puro e inocente, servindo de incentivo e encorajamento para continuar minha busca.*

À minha família (avós, tios, tias, primos, primas e agregados) por todo incentivo, atenção e carinho ofertados a mim durante todos esses anos, especialmente a Lorena (Biliu) e Alexandre Soledade, amo vocês.

*À minha namorada/companheira **Fernanda Oliveira** e toda à família pela força, paciência, carinho, amor, apoio e conforto nos momentos mais difíceis. Por me conceder sua família maravilhosa, você é muito importante para mim, amo você!*

*Aos meus sogros **Dalva e Aderbal**, assim como cunhados e agregadas, em especial o **Sr. Ricardo e Andréa**, pelo apoio e acolhimento durante minha estadia no estado de São Paulo.*

*Aos meus tios, **Marcos Soledade e Hélio Dórea**, pelo amor, confiança, amizade, por acreditarem em mim e me estimularem a ser uma pessoa melhor. Vocês são duas figuras paternas que levo no meu coração a todo o momento.*

*À um amigo (irmão) **Nadson Bastos** e toda a sua família que, de forma fraternal, sempre me incentivaram e comemoraram comigo a cada objetivo alcançado.*

Aos amigos “botucudos” em geral: República, UNESP, CERAM, Turma LI de medicina veterinária e Botupharma pela força e por tornarem os meus dias mais fáceis e felizes.

Aos amigos mais que especiais Raissa, Keylla, Gustavo e Charolês (Gabriel), Gabriela Amorim que, de alguma forma, cuidaram de mim em um momento delicado durante meu internamento no Hospital das Clínicas, UNESP-Botucatu.

Agradeço a todos os professores da UNESP-Botucatu, em especial Prof. Frederico Ozanam Papa, pelos ensinamentos e paciência. Muito obrigado por tudo.

Agradeço ao meu orientador José Antonio Dell’Aqua Junior e sua esposa Camila De Paula Freitas Dell’Aqua, pela confiança e credibilidade ofertados durante esses anos. Obrigado pela oportunidade.

Aos funcionários da UNESP-Botucatu, especialmente aos do Departamento de Reprodução Animal e Secretaria de Pós-Graduação, e a toda equipe Botupharma, por toda ajuda, amizade e confiança, vocês foram fundamentais para a realização dessa tese.

Agradeço a toda equipe da Central de Reprodução Marcelo Pessoa, por abrir as portas, colaboração, atenção e todo apoio prestado para realização desta tese.

Obrigado a todos os professores da Universidade Estadual de Santa Cruz - Ilhéus-BA, pela minha formação, em especial: Roberta Dias, Amauri Wenceslau, Paola Snoeck e Eduardo Gomes, muito obrigado por todos os ensinamentos, carinho e respeito ofertados a mim durante todos esses anos!

Aos meus amigos e colegas da UESC, em especial Murilo, Amanda, Igor, Diego e todos os outros que, de alguma forma, me incentivaram e fizeram parte da minha trajetória.

A CAPES, pelo apoio fornecido em forma de bolsa e auxílio financeiro.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a elaboração e sucesso deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

EROs	Espécies Reativas ao Oxigênio
CoQ10	Coenzima Q10
ATP	Adenosina Trifosfato
FADH ₂	Flavina-Adenina-Dinucleotídeo Reduzida
NADH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo Reduzida
Q	Ubiquinona
QH ₂	Ubiquinol
QH ⁻	Ubisemiquinona
O ₂ ⁻	Ânion Superóxido
O ₂	Oxigênio
H ₂ O	Água
H ⁺	Hidrogênio
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
OH ⁻	Radical Hidroxil
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
PUFAs	Ácidos Graxos Poli-Insaturados
SOD	Superóxido Dismutase
LOOH	Hidroperóxido Lipídico
4HNE	4-Hidroxinonenal
CAT	Catalase
GPx	Glutathione Peroxidase
MOT	Motilidade Total
MOP	Motilidade Progressivo
RAP	Espermatozoides Rápidos

IMP	Integridade da Membrana Plasmática
NCAP	Membrana Desestabilizada
PM	Potencial Mitocondrial

SUMÁRIO

RESUMO	01
ABSTRACT	03
CAPÍTULO 1	05
1.INTRODUÇÃO	06
2. REVISÃO DE LITERATURA	07
2.1. Metabolismo energético dos espermatozoides	07
2.2. Cadeia transportadora de elétrons e fosforilação oxidativa.....	08
2.3. Espécies reativas ao oxigênio.....	09
2.4. Ação das eros na função espermática	11
2.5. Peroxidação lipídica.....	13
2.6. Crioinjúrias	14
2.7. Antioxidantes	16
2.7.1. Antioxidantes enzimáticos.....	17
2.7.2. Antioxidantes não enzimáticos.....	18
2.8. Coenzima Q10	19
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
Hipótese	32
Objetivos específicos	32
CAPÍTULO 2	33
ARTIGO – Adição da coenzima Q10 sobre a viabilidade espermática de ganhões resistentes ou sensíveis à congelação	34
RESUMO	34
1.INTRODUÇÃO	35
2.MATERIAL E MÉTODOS	36
2.1 Reagentes	36
2.2 Aspectos éticos	36
2.3 Animais e colheita do sêmen	36
2.4 Congelação e descongelação do sêmen	36
2.5 Delineamento experimental	37
2.6 Classificação dos animais	37
2.7 Análise espermática	37
2.7.1 Cinética espermática	37
2.7.2 Avaliação por citometria de fluxo	38
2.8 Análise estatística	39
3. RESULTADOS	40
4. DISCUSSÃO	45
REFERÊNCIAS	49

RESUMO

CARNEIRO, J.A.M. AÇÃO DA COENZIMA Q10 SOBRE A VIABILIDADE ESPERMÁTICA DE GANHÕES RESISTENTES OU SENSÍVEIS À CONGELAÇÃO. Botucatu – SP. 2017, p.62. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Entre as vantagens da criopreservação seminal, destacam-se a otimização do uso de ganhões com comprovada superioridade genética, pela possibilidade do armazenamento de sêmen mesmo fora da estação de monta e a quebra das barreiras geográficas, que torna possível a remessa deste material para qualquer parte do mundo. Contudo, o processo de congelação de sêmen causa danos à célula espermática, sendo a peroxidação lipídica e o estresse oxidativo, ocasionada pela produção anormal de espécies reativas de oxigênio (EROs), as principais injúrias. Desta maneira, para se obter uma melhor qualidade seminal após a descongelação, é necessário adicionar aos diluentes seminais elementos que desempenhem função antioxidante, visando conter o aumento dos níveis dos agentes oxidantes. Coenzima Q10 (CoQ10) é um agente lipossolúvel promotor de energia, tendo como principal função transportar prótons e elétrons no processo de síntese de ATP na membrana mitocondrial interna, através da cadeia de transporte de elétrons. Ainda, a CoQ10 atua como um potente antioxidante em diversos sistemas biológicos, tais como, lipoproteínas e membranas, protegendo-os contra a oxidação, inibindo a formação de hidroperóxidos e, conseqüentemente, prevenindo a peroxidação lipídica. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação da coenzima Q10 (CoQ10) no espermatozoide de ganhões resistentes (RC) e sensíveis (SC) a congelação. Cada ejaculado (n=24) foi dividido em nove tratamentos e submetido à congelação, sendo a CoQ10 adicionada ao diluente de centrifugação, nas concentrações de 25 µmol/L (CE25), 50 µmol/L (CE50), 75 µmol/L (CE75) e 100 µmol/L (CE100), ou ao de congelação nas mesmas concentrações, 25 µmol/L (FE25), 50 µmol/L (FE50), 75 µmol/L (FE75) e 100 µmol/L (FE100). No grupo controle não houve adição da CoQ10 em nenhum dos meios diluentes. O processo de descongelação foi realizado à 37°C/30 segundos (T0) e, para avaliação após estresse térmico, 37°C/30 minutos (T30). Posteriormente, as células espermáticas foram avaliadas quanto a cinética, integridade da membrana plasmática (IMP), desestabilização da membrana (NCAP), produção de

espécies reativas ao oxigênio (H_2O_2 e O_2^-), atividade mitocondrial e peroxidação lipídica. De acordo com os resultados, não houve diferença significativa entre os grupos, tanto no momento T0 quanto no momento T30, para os garanhões classificados como RC ($p>0,05$), com exceção da peroxidação lipídica, que em ambos os momentos, os grupos tratados apresentaram valores menores quando comparados ao controle ($p<0,05$). Já para os animais classificados como SC, houve uma superioridade das células espermáticas tratadas com a CoQ10 ($p<0,05$), com exceção da concentração de O_2^- e potencial mitocondrial no T0, em que não apresentaram diferença entre os grupos ($p>0,05$). As células espermáticas do grupo CE75 se mostraram superiores aos parâmetros avaliados em relação aos demais grupos. Podemos concluir que a CoQ10 promove uma diminuição do estresse oxidativo e maior viabilidade ao espermatozoide de garanhões sensíveis ao processo de congelamento espermática.

Palavras-Chave: antioxidante, sêmen, criopreservação, equino.

ABSTRACT

CARNEIRO, J.A.M. ACTION OF COENZYME Q10 ON THE SPERM VIABILITY OF STALLIONS GOOD OR BAD FREEZERS. Botucatu – SP. 2017, p.62. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

Among the advantages of seminal cryopreservation, the optimization of using stallions with proven genetic superiority, the possibility of storing semen even outside the breeding season and the breaking of geographical barriers, which makes it possible to send this material to any part of the world can be highlighted. However, the process of semen freezing causes damage to the sperm cell, and the abnormal production of reactive oxygen species is caused by lipid peroxidation of the sperm membrane, which is a major cause of such injury. Thus, in order to obtain a better seminal quality after thawing, it is necessary to add to the diluents substances that play an antioxidant function, limiting levels of the oxidizing agents increase. Coenzyme Q10 is a liposoluble energy-promoting agent, whose main function is to transport protons and electrons in the process of ATP synthesis in the internal mitochondrial membrane, through the electron transport chain. Furthermore, CoQ10 (ubiquinol) acts as a potent antioxidant in several biological systems, such as lipoproteins and membranes, protecting them against oxidation, inhibiting the hydroperoxides formation and, consequently, preventing lipid peroxidation. In this way, the objective of this study was to discuss how CoQ10 may help reducing the oxidative stress caused by seminal cryopreservation process. This form, the objective of this study was to evaluate the antioxidant action of coenzyme Q10 (CoQ10) on spermatozoa from good freezers (GF) and bad freezers (BF) stallions. Each ejaculate (n=15) was divided into nine treatments and subject to freezing process. The CoQ10 was added to centrifugation extender at concentrations 25 $\mu\text{mol/L}$ (CE25), 50 $\mu\text{mol/L}$ (CE50), 75 $\mu\text{mol/L}$ (CE75) and 100 $\mu\text{mol/L}$ (CE100), or at the freezer extender at the same concentrations, 25 $\mu\text{mol/L}$ (FE25), 50 $\mu\text{mol/L}$ (FE50), 75 $\mu\text{mol/L}$ (FE75) and 100 $\mu\text{mol/L}$ (FE100). In the control group there was no addition of CoQ10 in any of the extenders. The thawing process was performed at 37°C/30 seconds (T0) and at 37°C/30 minutes (T30). Posteriorly, sperm cells were evaluated for kinetics, plasma membrane

integrity (PMI), membrane destabilization (NCAP), reactive oxygen species production (H_2O_2 and O_2^-), mitochondrial activity and lipid peroxidation. According to the results, there was no significant difference between the groups, as well T0 moment as T30 moment, for good freezer stallions ($p > 0.05$). However for bad freezer stallions, there was a superiority of the sperm cells that came into contact with CoQ10 ($p < 0.05$), except for the O_2^- concentration and mitochondrial potential (T0) in which there was no significant difference between the Groups ($p > 0.05$). The sperm cells of the CE75 group were superior in the evaluated parameters in relation to the other groups. We can conclude that CoQ10 promotes a reduction of oxidative stress and greater viability to the spermatozoa from bad freezer stallions at the freezing process.

Key-words: antioxidant, semen, cryopreservation, equine.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

A congelação de sêmen é uma biotecnologia que possui destaque na reprodução equina, uma vez que possibilita preservar o material genético por um tempo indeterminado, além de minimizar propagação de doenças e eliminar barreiras geográficas (MOORE et al., 2005). Entre as vantagens da criopreservação, destacam-se a otimização do uso de garanhões com comprovada superioridade genética, com a possibilidade do armazenamento de sêmen mesmo fora da estação de monta, que torna possível a remessa de sêmen para qualquer parte do mundo.

Diferente de outras espécies, não há seleção reprodutiva nos equinos, sendo selecionadas características morfologias e funcionais, havendo um grande número de garanhões com espermatozoides sensíveis à criopreservação (BRITO, 2007; MORILLO-RODRÍGUEZ et al., 2012).

O sucesso da criopreservação depende da qualidade do sêmen fresco, de interações entre diluidores, crioprotetores e curvas de congelamento e descongelamento, buscando minimizar os danos causados pelo choque térmico, formação de cristais de gelo, efeito solução e o estresse oxidativo (PICKETT;AMANN, 1992; JASKO, 1994).

Além das injúrias provocadas pelo processo de congelação do sêmen, a peroxidação lipídica da membrana plasmática ocasionada pela produção anormal de espécies reativas de oxigênio, um dos principais responsáveis por injúrias pós descongelação (MAXWELL;WATSON, 1996). Assim, diversos estudos demonstram a adição de antioxidantes aos meios diluidores na tentativa de neutralizar os efeitos nocivos das Espécies Reativas ao Oxigênio (EROs), uma vez que a manipulação, o armazenamento, a refrigeração e a congelação do sêmen resultam em aumento dos seus níveis (AURICH et al., 2007).

Desta maneira, para se obter uma melhor qualidade seminal após a descongelação, é necessário introduzir aos diluentes seminais elementos que desempenhem função antioxidante, visando conter o aumento dos níveis dos agentes oxidantes. Dentre as várias substâncias com função antioxidante citadas na literatura, a Coenzima Q10 (CoQ10) é conhecida como único lipídeo endogenamente sintetizado que apresenta função redox, um agente lipossolúvel promotor de energia, cuja principal função é o transporte de elétrons e prótons, levando à síntese de Adenosina Trifosfato (ATP) na membrana mitocondrial interna (LEWIN;LAVON, 1997; PATEL;SIGMAN, 2008; CAROCHO;FERREIRA, 2013).

A CoQ10 (ubiquinona) atua como um potente antioxidante em diversos sistemas biológicos, tais como, lipoproteínas e membranas, protegendo-os contra a oxidação, inibindo a formação de hidroperóxidos e, conseqüentemente, prevenindo a peroxidação lipídica (ALLEVA et al., 1997; BENTINGER et al., 2007; CAROCHO; FERREIRA, 2013)

A presente revisão tem por objetivo abordar aspectos relacionados à congelação do sêmen equino, os mecanismos envolvidos na produção de EROs, seus efeitos deletérios e benéficos ao sêmen de mamíferos, assim como a função da Coenzima Q10 e seus mecanismos antioxidantes de defesa celular envolvidos no processo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Metabolismo energético dos espermatozoides

O espermatozoide é formado por duas regiões principais: a cabeça onde está presente o DNA, o acrossomo e uma pequena quantidade de citoplasma; e a cauda, responsável pela motilidade da célula. Neste, está presente em sua porção inicial, a peça intermediária onde contém as mitocôndrias responsáveis pela produção de energia na forma de ATP (GARNER; HAFEZ, 1995).

A célula espermática é altamente especializada, responsável por transportar o pró-núcleo masculino em direção ao pró-núcleo feminino. Para tal, requer um metabolismo energético que produza energia suficiente para o deslocamento celular dentro do útero, que ocorre, principalmente, por fosforilação oxidativa dentro das mitocôndrias presentes na peça intermediária (SQUIRES et al., 1999).

As mitocôndrias estão localizadas exclusivamente na peça intermediária das células espermáticas e são responsáveis pela produção de ATP. As principais vias metabólicas para a síntese de energia são a glicólise e a fosforilação oxidativa. Devido a uma ineficiência na metabolização da frutose pelas células espermáticas dos equinos, a glicose é a principal fonte de energia nesta espécie (VARNER; JOHNSON, 2007), sendo esta convertida em seis moléculas de dióxido de carbono, seis moléculas de água e 31 moléculas de ATP. Esta metabolização pode ocorrer também nas fibras externas densas do flagelo, local onde se encontram as enzimas glicolíticas, enquanto que a fosforilação oxidativa ocorre exclusivamente nas mitocôndrias (FERRAMOSCA; ZARA, 2014).

Cinco importantes etapas fazem parte da produção energética dentro da mitocôndria, sendo glicólise, complexo piruvato-desidrogenase, ciclo do ácido cítrico, cadeia de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa, gerando ATP necessário para a movimentação e manutenção das células espermáticas (NELSON;COX, 2014).

2.2 Cadeia transportadora de elétrons e fosforilação oxidativa

A fosforilação oxidativa é o processo pelo qual a mitocôndria realiza a oxidação das moléculas e produz ATP. Este sistema está localizado na bicamada lipídica e formado por cinco complexos enzimáticos multiproteicos (I-V) e dois carreadores de elétrons, coenzima Q e citocromo c (SMEITINK, 2001).

A diferença de gradiente entre prótons e elétrons, entre a matriz mitocondrial e o espaço intermembrana da mitocôndria, faz com que os prótons cruzem a membrana mitocondrial interna utilizando a ATP-sintase para síntese de ATP (SARASTE, 1999)

Para o entendimento através do qual são formados os radicais livres é necessária a compreensão de todos os passos oxidativos na degradação de moléculas ricas em energia para estado final da respiração celular. Diversos processos de redução do oxigênio nas mitocôndrias podem ter como resultado final a produção de radicais livres, altamente nocivos a célula (NELSON;COX, 2014).

A via comum pelo qual os elétrons de diferentes vias metabólicas fluem para o oxigênio é através da cadeia transportadora de elétrons, localizada na membrana interna da mitocôndria. (CHAMPE et al., 2006).

A fosforilação oxidativa ocorre mais precisamente nas cristas da membrana mitocondrial interna. As moléculas de Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NADH) e Flavina-Adenina Dinucleotídeo (FADH₂) oriundas do ciclo de Krebs e da glicólise, doam elétrons para a primeira proteína mitocondrial, denominada de complexo I e II, respectivamente. Estes elétrons percorrem toda a crista sendo transportados pela coenzima Q (ubiquinona) em sua forma reduzida QH₂ (ubiquinol) para o complexo III. A partir daí os elétrons são transportados ao complexo IV através do citocromo C e se ligam as moléculas de oxigênio (O₂) e prótons de hidrogênio H⁺ formando água (FINKEL;HOLBROOK, 2000).

Durante este transporte, prótons de hidrogênio migram da matriz mitocondrial para o espaço inter membranas. Ao final da cadeia estes prótons geram energia e passam

através do complexo V ou ATPsintase, originando uma molécula de ATP (NELSON;COX, 2014)

Durante esse processo, eventualmente, elétron do intermediário instável do ciclo Q (redução da ubiquinona em ubiquinol) pode migrar por transferência direta de elétrons para o oxigênio molecular, dando origem a primeira EROs, o íon superóxido (O_2^-). A geração de superóxido é não enzimática e, portanto, quanto maior a taxa de metabolismo, maior será a produção de EROs (GREEN et al., 2004; FERRAMOSCA;ZARA, 2014).

2.3 Espécies reativas ao oxigênio (EROs)

Radicais Livres são os metabólitos oriundos do oxigênio que apresentam definidos como qualquer íon, átomo ou molécula, altamente energéticas e instáveis, ou seja, possuem um número ímpar de elétrons em sua última camada. Naturalmente, o organismo produz radicais livres e outras espécies reativas oriundas do próprio metabolismo, como subprodutos da respiração e da síntese de estruturas mais complexas. Porém, esses radicais tendem a se ligar a outro elétron buscando alcançar a estabilidade (FERREIRA;MATSUBARA, 1997; SOUZA;FERREIRA, 2007).

As EROs são todos os radicais e não radicais derivados do oxigênio, formadas e degradadas por todos os organismos aeróbicos. São necessárias para o funcionamento celular normal, importantes na capacitação espermática, na reação do acrossomo e na interação entre o espermatozoide e o oócito, desde que se encontre em concentrações fisiológicas (BURNAUGH et al., 2007). Por outro lado, quando em excesso, são prejudiciais e geram o estresse oxidativo (NORDBERG;ARNÉR, 2001), consequentemente a diminuição de motilidade e da viabilidade espermática (AITKEN et al., 2014; VARNER et al., 2014)

Em um estudo realizado por Gibb et al. (2014), correlacionaram danos celulares provocados pela produção de EROs, viabilidade espermática e taxa de prenhez em animais da raça Puro Sangue Inglês. O sêmen que resultou em prenhez, e consequentemente considerado de maior fertilidade, apresentou maior quantidade na produção de EROs. Os autores concluíram que apesar os animais produzirem elevados níveis de EROs, os mesmos possuem mecanismos fisiológicos capazes de neutralizar a ação deletéria desses compostos, e que a presença de antioxidantes no sêmen também é necessária para evitar a produção excessiva do ânion superóxido.

Em contrapartida, em estudos realizados com humanos, foi constatado que o estresse oxidativo está entre as principais causas de infertilidade (AGARWAL et al., 2014; AITKEN et al., 2014)

Para que ocorra um funcionamento ideal do sistema aeróbico, deve haver um equilíbrio entre a quantidade de EROs produzidas e removidas pelo sistema antioxidante celular (HALLIWELL;GUTTERIDGE, 1999; MAIA;BICUDO, 2009). Apesar da relação entre a fertilidade e a produção das espécies reativas ao oxigênio não estar totalmente elucidada, quando se trata de armazenamento, a presença das EROs provoca danos irreversíveis como lesão de DNA, fragmentação da membrana plasmática e, conseqüentemente, diminuição da funcionalidade espermática (VARNER et al., 2014).

Durante o processo de redução do oxigênio molecular são formados intermediários reativos como os radicais superóxido (O_2^-), óxido nítrico (NO) e hidroxila (OH^\bullet), além do não radical peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (MAIA;BICUDO, 2009).

O radical superóxido é produzido, principalmente, na matriz mitocondrial e, devido a sua incapacidade de penetrar em membranas lipídicas, esse radical age somente no local onde for produzido. É formado pela adição do elétron presente na membrana fosfolipídica interna da mitocôndria, que eventualmente reage com o oxigênio da matriz mitocondrial, dando origem ao radical. Porém, também pode ser produzido por flavoenzimas, lipoxigenases e cicloxygenases. Apesar de pouco reativo, é o precursor do sistema de formação das EROs, participando da formação do peróxido de hidrogênio através da ação da enzima superóxido dismutase (NORDBERG;ARNÉR, 2001; NICHI, 2003; MAIA;BICUDO, 2009; ANDRADE et al., 2010).

Assim como o radical superóxido, o óxido nítrico é um radical livre com baixa reatividade com a maioria das biomoléculas. Por outro lado, possui a característica de reagir com outros radicais livres como os radicais peroxil e alquil, gerando moléculas menos reativas e inibindo a peroxidação dos lipídios nas membranas celulares (NORDBERG;ARNÉR, 2001).

O peróxido de hidrogênio não é um radical livre pois não possui em sua última camada um elétron livre, porém é um metabólito do oxigênio altamente reativo e deletério as células porque participa como intermediário na reação que produz o radical hidroxil (OH^\bullet), possui a meia vida longa e é capaz de atravessar as camadas fosfolipídicas da membrana plasmática, possuindo uma elevada propriedade de difusão biológica (ANDRADE et al., 2010; BARBOSA et al., 2010). Reage tanto com o ânion superóxido

(reação de Haber-Weiss), quanto com o íon férrico livre para formar hidroxila altamente reativa (reação de Fenton) (SIKKA, 2001).

Segundo BAUMBER (2003) o peróxido de hidrogênio é o principal EROs causador de queda de motilidade no espermatozoide equino. Uma vez produzido, o H_2O_2 é removido por um dos três sistemas de enzimas antioxidantes: catalase, glutathione peroxidase e peroxiredutases (NORDBERG;ARNÉR, 2001).

O OH° é formado a partir da reação de Fenton, tendo como precursor o peróxido de hidrogênio. Muito energético e de curta duração, este radical é catalisado pelos íons ferro (Fe^{++}) ou cobre (Cu^{++}) (SIKKA, 2001). Combina-se de forma rápida a outros radicais, ou metais, sendo o mais reativo e nocivo dentre as EROs para o sistema biológico, promovendo assim danos ao DNA, inativação proteica e peroxidação dos lipídeos através da retirada de um átomo de hidrogênio dos Ácidos Graxos Poli-Insaturados (PUFAs) da membrana celular (MAIA & BICUDO, 2009; ANDRADE et al., 2010; BARBOSA et al., 2010).

2.4 Ação das EROs na função espermática

O metabolismo aeróbico tem como produto a geração de moléculas pró-oxidantes, os radicais livres ou EROs. O equilíbrio intracelular é mantido através de uma complexa interação entre EROs e antioxidantes. Quando os agentes oxidantes sobrecarregam o sistema antioxidante de defesa celular, inicia-se um processo de estresse oxidativo (AGARWAL et al., 2006).

O excesso de espécies reativas ao oxigênio está associado a reações específicas e inespecíficas em componentes celulares, tais como lipídeos insaturados, proteínas e DNA, prejudicando o funcionamento celular (GHARAGOZLOO;AITKEN, 2011). Estudos têm correlacionados altas concentrações de EROs com declínio da qualidade espermática e fragmentação do DNA em garanhões (BAUMBER et al., 2003), suínos (VALENÇA;GUERRA, 2007), cães (KAWAKAMI et al., 2007; NEAGU et al., 2011), homens (COCUZZA et al., 2007), touros (FERNÁNDEZ-SANTOS et al., 2008) e carneiros (MATA-CAMPUZANO et al., 2012).

O processo de capacitação e hiperativação é imprescindível para que o espermatozoide consiga penetrar e fertilizar o oócito (HO;SUAREZ, 2001). Estudos realizados por O'flaherty et al. (1999), evidenciaram a inibição da capacitação após a adição de superóxido dismutase (SOD) ao sêmen, o que não ocorre após a adição do ânion

superóxido. Em bovinos, a adição de peróxido de hidrogênio ao sêmen promoveu a reação acrossomal (GUALTIERI et al., 2014). Estes resultados demonstram a importância das EROs na capacitação espermática e reação acrossomal.

Em estudo realizado por Burnaugh et al. (2007) em equinos, foi observado um aumento significativo na produção do ânion superóxido quando incubaram espermatozoides com cálcio ionóforo, simulando as condições da capacitação espermática, demonstrando assim a importância das EROs neste processo. Porém, elevadas concentrações destes elementos podem ocasionar sérios danos à célula espermática (VALENÇA;GUERRA, 2007). O processo de capacitação pode ser acelerado com o aumento das concentrações de EROs, assim como pode ser retardado quando os agentes antioxidantes são amplamente removidos (FORD, 2004).

Ao incubar o espermatozoide humano na presença de elevadas concentrações de oxigênio, pesquisadores observaram uma perda acentuada da motilidade, o que não acontecia quando era adicionado o antioxidante enzimático catalase, nas mesmas condições. Os autores sugeriram que essa perda ocorria por ação do H_2O_2 gerado pela segunda reação de redução do O_2 , realizada na matriz mitocondrial dos próprios espermatozoides (AITKEN, 1995).

Em um estudo realizado na espécie bovina, pesquisadores adicionaram Fe^{+2} e ascobarto. De acordo com os autores, a reação dessas duas moléculas deu origem ao radical hidroxil, altamente reativo, e após seis horas de incubação foi observada uma queda nos parâmetros de motilidade total e aumento no índice de fragmentação de DNA. Porém, não houve diferença entre a viabilidade espermática e integridade do acrossoma (FERNÁNDEZ-SANTOS et al., 2008)

Os elevados níveis do radical hidroxil comprometem o funcionamento da célula espermática, pois o OH° desnatura enzimas como a succinato desidrogenase, importante no funcionamento normal do ciclo do ácido cítrico. Além disso, este radical desnatura enzimas do complexo I, comprometendo o transporte de elétrons e a produção de ATP, refletindo diretamente na motilidade espermática (RAHA;ROBINSON, 2000).

De forma geral, os radicais livres provocam o aumento dos poros transitórios da mitocôndria, aumentando sua permeabilidade e permitindo a entrada de sinalizadores responsáveis por induzir a apoptose celular (TURRENS, 2003; FORD, 2004).

2.5 Peroxidação lipídica

A peroxidação de lipídios é definida como uma cascata de eventos bioquímicos, resultante da ação dos radicais livres, provocando a deterioração oxidativa dos lipídeos poli-insaturados das membranas celulares. Os ácidos graxos poliinsaturados são, devido a suas múltiplas duplas ligações, excelentes alvos para o ataque de radicais livres (REPETTO et al., 2010).

A peroxidação resulta, principalmente, na formação do radical alquil, alcóxil e peróxil, levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e à morte celular. As EROs iniciam o processo de peroxidação nas cadeias lipídicas das PUFAS que se propaga por radicais peróxil, resultando na formação de hidroperóxidos lipídicos e aldeídos citotóxicos, tais como o malondialdeído (MDA), 4-hidroxi-nonenal e isoprostanos (NORDBERG;ARNÉR, 2001; LIMA;ABDALLA, 2001).

A lipoperoxidação consiste, basicamente, na incorporação de oxigênio molecular a um ácido graxo poli-insaturado da membrana celular, produzindo hidroperóxido lipídico (LOOH) como produto primário inicial. Consequentemente à retirada de hidrogênio, evento que inicia a peroxidação lipídica, é desencadeado uma série de eventos que resultam na geração de aldeídos eletrofílicos tais como acroleína, 4-hidroxi-nonenal (4HNE), e de malondialdeído (AITKEN et al., 2014).

A peroxidação lipídica prejudica a capacidade de fusão da membrana celular por alterar sua estrutura e permeabilidade, assim como a fluidez. Esta habilidade possui uma grande importância no processo de reação acrossomal e, consequentemente, na fertilidade (MAIA;BICUDO, 2009; BALL, 2011).

As proteínas e DNA também sofrem modificações oxidativas e perdas por aldeídos, tais como o 4HNE. Como resultado, o efeito eletrofílico gerado por essas modificações estimula a geração de EROs mitocondrial provocando uma via apoptótica intrínseca, levando a uma rápida perda de motilidade e morte celular (GANDINI et al., 2000; AITKEN et al., 2014).

No sêmen de homens férteis e inférteis, os espermatozoides defeituosos ou menos resistentes ao estresse oxidativo apresentam níveis de lipoperoxidação mais altos que o observado nos espermatozoides funcionais (AITKEN et al., 1996; MISRO et al., 2004)

No sêmen de touros, as amostras com menor motilidade e vigor apresentaram maior susceptibilidade a lipoperoxidação. Além disso, os espermatozoides que apresentaram maior susceptibilidade à lipoperoxidação e menor motilidade apresentaram

menor reação acrossomal. De acordo com os autores, a peroxidação de lipídios causa danos à membrana plasmática, pois a reação acrossomal é observada apenas em células com integridade de membrana plasmática (BEORLEGUI et al., 1997).

Pesquisadores avaliaram a lipoperoxidação no espermatozoide de cordeiros com exame andrológico satisfatório, questionável e insatisfatório. No grupo de animais com exame andrológico insatisfatório, os níveis de lipoperoxidação foi significativamente maior do que nos outros grupos, enquanto que a porcentagem de células morfológicamente normais e com motilidade progressiva foi menor. De acordo com esse estudo, altos níveis de peroxidação foram negativamente correlacionados com a motilidade e a morfologia espermática (KASIMANICKAM et al., 2006)

Aparentemente, os espermatozoides equinos demonstram ser os mais susceptíveis ao processo de peroxidação da membrana quando comparados a outras espécies (NEILD et al., 2005; BALL, 2008). Entretanto, o processo de criopreservação aumenta a susceptibilidade destas células ao processo de peroxidação (AURICH, 2005). Os danos são mais evidenciados na região da peça intermediária (NEILD et al., 2005).

Em condições de estocagem em baixas temperaturas, principalmente no processo de congelação, há um aumento da peroxidação lipídica e da oxidação de aminoácidos aromáticos, levando a indução da apoptose nas células espermáticas (MAXWELL & WATSON, 1996). Os efeitos do estresse oxidativo são particularmente importantes durante a congelação, pois a maior parte da capacidade antioxidante do sêmen está contida no plasma seminal, que é removido durante o processo (BALL, 2008).

2.6 Crioinjúrias

A viabilidade celular está correlacionada com fatores físicos, morfológicos, bioquímicos e metabólicos da célula espermática. Para o funcionamento celular normal é necessário que todos os seus componentes e funções estejam preservados (GRAHAM et al., 1980).

O estresse oxidativo é um dos principais fatores que contribuem para a baixa qualidade seminal. A criopreservação provoca diversas alterações na membrana plasmática do espermatozoide, as quais acarretam diminuição do potencial de fertilidade da célula (BUCAK et al., 2010).

A curva de congelação é muito importante na manutenção da integridade celular. Em uma curva muito rápida, não há desidratação dos espermatozoides, possibilitando a

formação de gelo intracelular, sendo prejudicial à célula. Já na curva de congelação lenta, haverá a desidratação dos espermatozoides impedindo a formação de gelo intracelular, porém a alta concentração de solutos também pode causar danos à célula (WATSON, 1995).

Um dos testes mais utilizados é a porcentagem de espermatozoides móveis (CONTRI et al., 2010). Trata-se de um teste funcional que demonstra o status energético do espermatozoide. A motilidade é necessária para a penetração na junção útero-tubárica, para a fecundação (QUINTERO-MORENO et al., 2004).

Em estudo realizado por Ferreira (2000) demonstrou que os parâmetros de motilidade são representantes da qualidade espermática em amostras seminais congeladas. Esta avaliação da cinética espermática pode ser comprometida se as mitocôndrias estiverem afuncionais, a membrana plasmática lesada ou se os espermatozoides sofrerem choque-frio (KIRK, 2001). Além disso a disfunção mitocondrial pode levar à formação de EROs, o que resulta em capacitação prematura em espermatozoides criopreservados (REDDY et al., 2010).

Oehninger et al. (2000) observaram que o decréscimo da motilidade progressiva é um dos principais indicadores de danos causados pela criopreservação e pode conseqüentemente causar queda de fertilidade. Além disso Blottner et al. (2001) demonstraram que a criopreservação resulta em uma mudança na linearidade e hiperatividade dos espermatozoides.

A avaliação da integridade da membrana plasmática é outro forte indicativo da viabilidade espermática, uma vez que as membranas são suscetíveis à danos externos. Esta integridade pode ser avaliada utilizando-se corantes fluorescentes supravitalis (GRAVANCE et al., 2001). A congelação ocasiona modificações biofísicas e bioquímicas na membrana plasmática espermática, levando à diminuição da integridade da membrana plasmática e viabilidade (BUCAK et al., 2010).

A reação do acrossomo é um passo essencial da fertilização, assim a avaliação do acrossomo também é um parâmetro importante para caracterizar a viabilidade espermática e prever a fertilidade de um sêmen (FENICHEL, 1995). Blottner et al. (2001) observaram que as alterações do acrossomo são os principais defeitos espermáticos que aumentam durante a criopreservação do sêmen de garanhões. A fragmentação do DNA espermático é um dos marcadores para apoptose, podendo alterar a capacidade fecundante do espermatozoide ou ocasionar alterações no desenvolvimento embrionário (DONNELLY et al., 2000).

Nos equinos é conhecida a correlação negativa entre o nível de fragmentação de DNA e fertilidade (KENNEY et al., 1994). Estudo realizado por Celeghini (2005) concluiu haver baixa alteração nos níveis de fragmentação de DNA decorrente da criopreservação nos espermatozoides bovinos.

Estudo realizado por Thomas et al. (2006) observou que a criopreservação aumenta as alterações de lipídios e codificação de fosfolipídios da membrana espermática em equinos, entretanto nesta espécie as alterações da membrana plasmática e na fosforilação da proteína tirosina, ocasionadas pela criopreservação, diferem das ocasionadas pela capacitação espermática *in vitro*.

Ball (2008) apontou como causa para baixa fertilidade os danos mitocondriais provocados pelo processo de criopreservação espermática. O processo de congelamento e descongelamento dos espermatozoides prejudicam as funções bioenergéticas e fisiológicas das mitocôndrias, além de levar a formação de EROs e, conseqüentemente, a capacitação precoce destas células.

Estudos demonstraram que a criopreservação ocasiona estresse oxidativo aos espermatozoides. O processo de congelamento de sêmen causa injúrias à célula espermática, sendo a produção anormal de espécies reativas de oxigênio ocasionada pela peroxidação lipídica da membrana espermática, um dos principais responsáveis por tais injúrias (MAXWELL;WATSON, 1996). O uso de aditivos, dentre eles os antioxidantes, pode reduzir a capacitação prematura nos espermatozoides.

2.7 Antioxidantes

Antioxidantes são substâncias ou moléculas enzimáticas e não enzimáticas capazes de prevenir, interceptar ou reparar a ação dos agentes oxidantes, convertendo-os em água, protegendo as células e o organismo dos efeitos nocivos ocasionados pela superprodução de EROs (ANDRADE et al., 2010; LUZ et al., 2011).

O primeiro mecanismo de defesa celular contra as EROs é prevenindo sua própria formação e, conseqüentemente, o início das reações em cadeia. Além disso, auxiliados por proteínas ligantes de metais como a ferritina, transferrina e, no caso dos equinos, a lactoferrina, o ferro e o cobre também participam da primeira linha de defesa celular (INAGAKI et al., 2002).

Uma vez formadas as EROs, os antioxidantes irão agir na interceptação, conhecida também como fase de desativação, transformando os radicais livres em produtos finais não reativos (SIES, 1997).

Após o metabolismo oxidativo ser ativamente realizado pelas mitocôndrias, de 0,1 a 4% do O_2 utilizado na respiração chega a formar O_2^- , o que é suficiente para provocar danos as células espermáticas. Por conta disso, é necessário que agentes antioxidantes neutralizem rapidamente o radical superóxido (NELSON;COX, 2014).

Para isso, tanto as células espermáticas quanto o plasma seminal, possuem compostos responsáveis por proteger os espermatozoides das EROs formadas por leucócitos e espermatozoides anormais, com ação de prevenir a fragmentação do DNA, reduzir as crioinjúrias e bloquear a maturação espermática precoce (AGARWAL et al., 2008). Devido a isso, são amplamente adicionadas aos meios diluidores de sêmen, substâncias naturais e sintéticas com funções antioxidantes (LENZI et al., 2000)

Os antioxidantes podem ser definidos como enzimáticos e não enzimáticos. Os antioxidantes enzimáticos são também denominados de agentes naturais, sendo o primeiro sistema de defesa a agir no organismo sendo eles: SOD, a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) (ANDRADE et al., 2010; LUZ et al., 2011). Dentre os antioxidantes não enzimáticos destacam-se o α -tocoferol (vitamina E), o ácido ascórbico (vitamina C), quercetina, butil-hidroxitolueno (BHT) e CoQ10 (LENZI et al., 2002; ANDRADE et al., 2010, CHAVES-SILVA, 2016, ARAÚJO, 2016).

2.7.1 Antioxidantes enzimáticos

Normalmente encontradas nos peroxissomos, a CAT é uma enzima presente nas mitocôndrias das células espermáticas e plasma seminal dos mamíferos, cuja função é decompor H_2O_2 em H_2O e O_2 (ANDREYEV et al., 2005; SILVA;GUERRA, 2011). De acordo com Vishwanath;Shannon (2000), em condições de armazenamento prolongado a adição de catalase ao meio de congelação possui resultado benéfico, uma vez que reduz a produção de peróxidos endógenos. No sêmen congelado e descongelado, o uso da catalase é benéfico devido a alta concentração de H_2O_2 liberado pelos espermatozoides mortos após este processo (SHANNON;CURSON, 1972).

Com a função de converter duas moléculas de O_2^- em H_2O_2 e O_2 através da reação da desmutase, a SOD é encontrada na matriz mitocondrial, no citosol e plasma seminal sendo um antioxidante enzimático (RAHA;ROBINSON, 2000; LAMBERT;BRAND,

2004). Na espécie ovina, foi adicionada à SOD ao sêmen promovendo uma diminuição dos níveis de O_2^- . Na mitocôndria, o superóxido é formado em concentrações relativamente altas, devido ao escape de elétrons da cadeia respiratória (NORDBERG;ARNÉR, 2001).

Presente na matriz mitocondrial, espaço intermembranas e citosol, a GPx possui um papel antioxidante ao retirar H^+ e elétrons de duas moléculas de glutathiona reduzida doando ao H_2O_2 . Como produto dessa reação tem-se duas moléculas de água e uma de Glutathiona oxidada (VENDITTI et al., 2013). De acordo com Imai;Nakagawa (2003), a GPx pode reagir com peróxido de hidrogênio e uma ampla variedade de hidroperóxidos de lipídios sendo, portanto, considerada responsável pela proteção da membrana contra os danos oxidativos.

2.7.2 Antioxidantes não enzimáticos

Compostos de baixo peso molecular são reparadores de lesões já iniciadas, como também removedores dos agentes causadores dos danos oxidativos. Estão inseridos nesse grupo a vitamina A, ácido α -lipóico, ácido úrico, zinco, taurina, hipotaurina, todos presentes no plasma seminal. Porém, os de maior relevância para a reprodução são o α -tocoferol (vitamina E), o ácido ascórbico (vitamina C), quercetina, butil-hidroxitolueno (BHT) e CoQ10 (LENZI et al., 2002; ANDRADE et al., 2010, CHAVES-SILVA, 2016, ARAÚJO, 2016).

Importante antioxidante não enzimático, a vitamina C é capaz de doar elétrons e H^+ às EROs, funcionando como agente redutor e transformando-as em compostos inofensivos. Trata-se de uma vitamina hidrossolúvel que tem sido considerada o mais importante antioxidante do fluido extracelular. Ela age em conjunto com a vitamina E e é capaz de estagnar diretamente a reação em cadeia da peroxidação lipídica (WRIGHT et al., 2001).

Encontrada em grande quantidade nos lipídios das membranas celulares, a Vitamina E compõe um grupo de antioxidantes lipossolúveis. Ela contém um grupo hidroxila através do qual reage com elétrons desemparelhados, podendo assim, reduzir radicais peroxil bloqueando a etapa de propagação da peroxidação lipídica (ANDRADE et al., 2010; CAROCHO;FERREIRA, 2013).

O BHT é um análogo da vitamina E, cujo efeito protetor é atribuído a dois mecanismos: o aumento da fluidez da membrana plasmática após a incorporação do

antioxidante e sua capacidade de conter a cascata de peroxidação lipídica pela conversão de peróxido em hidroperóxido lipídico (AITKEN;CLARKSON, 1988).

A quercetina é um antioxidante natural não enzimático do grupo dos flavonoides, sendo sua eficácia relacionada à grande quantidade de OH encontradas em sua estrutura. (ALRAWAIQ;ABDULLAH, 2014). Esta molécula é capaz de reagir diretamente com o O_2^- e o OH^- , doando elétrons e H^+ para estes radicais resultando na formação de H_2O_2 e H_2O respectivamente. Ao fim deste processo, o antioxidante é convertido em um radical livre pouco reativo (WRIGHT et al., 2001).

O antioxidante da CoQ10 é um agente lipossolúvel promotor de energia, tendo como principal função o transporte de elétrons e prótons no processo de produção de energia, levando à síntese de ATP na membrana mitocondrial interna, através da cadeia de transporte de elétrons. Esta coenzima pode ser encontrada em todas as membranas celulares de mamíferos (PATEL;SIGMAN, 2008; CAROCHO;FERREIRA, 2013).

2.8 Coenzima Q10

Este composto é uma quinona lipossolúvel (2,3 dimetoxi-5 metil- 6-decaprenil benzoquinona), semelhante a uma vitamina e que na sua forma pura apresenta-se como pó cristalino (BHAGAVAN;CHOPRA, 2007). A CoQ10 pode ser obtida por duas vias: por via exógena pela ingestão de alimentos, como brotos de soja, amêndoas, nozes, vegetais verdes, carnes, aves domésticas e em alguns peixes, como sardinhas e por via endógena, pelo ciclo do mevalonato (KUMAR et al., 2009).

No organismo de humanos e animais é encontrada na forma reduzida (ubiquinol 10 – CoQH₂), presente predominantemente no coração, rins e fígado, e na forma oxidada (ubiquinona – CoQ10), que é abundante em cérebro e intestino (NOHL et al.,1998).

Na célula espermática, a maior concentração de CoQ10 ocorre nas mitocôndrias presentes na peça intermediária, local de intensa produção de energia. A CoQ10 pode ser encontrada em três estados redox: totalmente oxidada (ubiquinona, Q), parcialmente reduzida (semiquinona ou ubisemiquinona, QH⁻) e totalmente reduzida (ubiquinol, QH₂ ou CoQH₂) (GENOVA;LENAZ, 2011) (Figura 1).

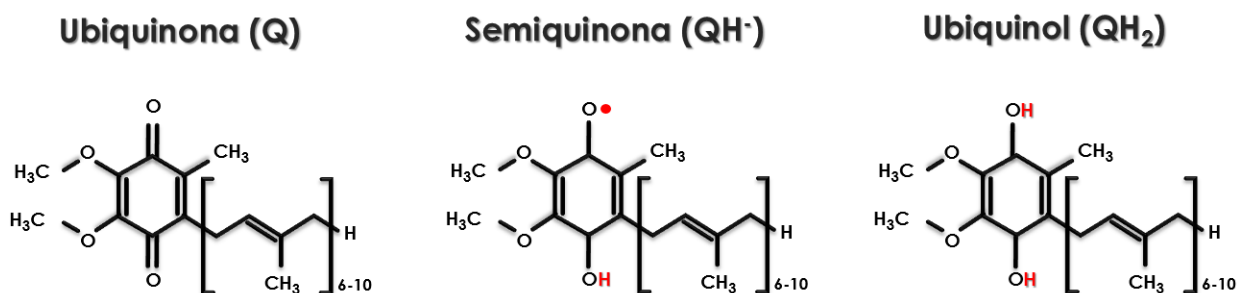


FIGURA 1. Estrutura molecular da Ubiquinona (Q), Semiquinona (QH⁻) e ubiquinol (QH₂). (Acervo pessoal)

O ciclo da coenzima Q inicia-se através da forma oxidada ubiquinona (Q), que passa ao seu estado reduzido (QH₂) ao receber dois elétrons e dois prótons do complexo I (NADH) ou II (FADH₂) atravessando a membrana interna mitocondrial, fornecendo dois prótons para o espaço intermembrana e transferindo o par de elétrons ao citocromo C no complexo III, retornando ao seu estado oxidado (COVIAN et al., 2007; TRUMPOWER, 1990).

O ubiquinol atua como um excelente agente antioxidante nos diversos sistemas biológicos, tais como, lipoproteínas e membranas, inibindo a formação de hidroperóxidos e assim protegendo-os contra a oxidação, prevenindo desta forma a peroxidação lipídica (BENTINGER et al., 2007; CAROCHO; FERREIRA, 2013). Este cofator também atua na fase de iniciação da propagação da peroxidação lipídica, neutralizando os radicais lipídicos após a sua formação (TURUNEN et al., 2004).

Um estudo avaliou o efeito da CoQ10 sobre a CAT, SOD e F2-isoprostanos, um biomarcador para peroxidação lipídica, no plasma seminal de homens inférteis. O grupo que recebeu a suplementação de CoQ10 teve maior atividade das enzimas catalase e SOD, acompanhado por diminuição do isoprostano. Houve também uma correlação positiva entre as concentrações de CoQ10 e morfologia espermática normal, CAT e SOD. Diante dos resultados, os pesquisadores constataram que o CoQ10 pode atenuar o estresse oxidativo no plasma seminal, proporcionando uma melhoria das características seminais e atividade das enzimas antioxidantes (NADJARZADEH et al., 2012).

Em estudo realizado por Granollerz et al. (2011) com humanos, foi observado uma diminuição significativa de espermatozoides com vacúolo de grado e fragmentação do DNA após um mês de tratamento oral utilizando L-carnitina e CoQ10. Os autores a despeito do curto período de tratamento, não contemplando assim o período completo da espermatogênese, há um mecanismo de proteção pós-testicular realizada por estas

substâncias antioxidantes. Esta proteção está associada a ação no metabolismo energético espermático promovido pela L-carnitina em conjunto com o potencial antioxidante lipossolúvel para as membranas celulares e lipoproteínas da CoQ10.

Em estudo realizado por Lewin;Lavon (1997), utilizando sêmen de homens com astenozoospermia, foi observado um aumento da motilidade após incubação com 50 μM de CoQ10 a 37°C por 24 horas, quando comparado ao controle. De acordo com os resultados, o composto foi eficaz na prevenção da fragmentação do DNA, o qual diferiu a partir de 3 horas de incubação, e na motilidade total e progressiva, diferindo a partir de 2 horas após a incubação.

Ognjanovi'c et al. (2010) avaliaram o efeito da CoQ10 e vitamina E em células testiculares de ratos com peroxidação lipídica induzida por cadmium. Os resultados demonstraram que estas substâncias antioxidantes foram capazes de diminuir o estresse oxidativo assim como aumentar a atividade da SOD e CAT no testículo destes animais.

Em estudo realizado com pacientes normais e oligospermicos com parâmetros de cinética espermática considerados dentro dos valores normais para a espécie humana, foi testado uma solução a base de zinco (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + d-aspartato (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + CoQ10 (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$), o qual foi usado no grupo tratamento. De acordo com os resultados, após 6 horas de incubação, o composto impediu a queda da motilidade quando comparado à amostra controle, e manteve os parâmetros cinéticos médios iniciais dos espermatozoides, além de prevenir a peroxidação lipídica e impedir a fragmentação do DNA espermático (TALEVI et al., 2013).

Este mesmo composto foi testado por Gualtieri et al., (2014) avaliando características espermáticas em touros. Foi utilizado sêmen descongelado, fazendo a incubação *in vitro* a 37°C por 5 horas, realizando avaliações a cada 1 hora. Como resultado, o composto manteve os parâmetros cinéticos médios iniciais dos espermatozoides, preveniu a peroxidação lipídica e impediu a fragmentação do DNA espermático.

Em caprinos, Datta et al. (2009) estudaram três diluentes contendo lecitina de soja, CoQ10 e a associação de ambas, preparados em meio livre de eletrólitos e contendo glicerol, utilizando espermatozoides na cauda do epidídimo preservados *in situ* a -10°C, durante de 7 e 21 dias. De acordo com os resultados, houve diferença entre todos os parâmetros avaliados nos diferentes momentos, sendo que os autores concluíram que o grupo em que houve a associação da lecitina de soja e a CoQ10 foi mais eficaz na proteção espermática contra o choque térmico pelo frio, sendo responsável pelo maior percentual

de motilidade progressiva e integridade da membrana plasmática, atribuindo tais benefícios principalmente à CoQ10.

Na espécie equina, Yousefian et al. (2014) avaliaram a CoQ10, nas concentrações de 1 e 2 μM , isoladas e em associação com o α -tocoferol (5 e 10 mM), durante a refrigeração do sêmen a 5°C por 48 horas. De acordo com os resultados, houve maiores percentuais de motilidade progressiva, integridade (através da coloração eosina-nigrosina) e funcionalidade (ao teste hiposmótico) da membrana plasmática, e contra a peroxidação lipídica, utilizando a CoQ10 (1 μM) associada ao α -tocoferol (5 mM).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença das EROs, em concentrações moderadas, é imprescindível no processo de desestabilização da membrana, reação acrossomal, capacitação e hiperativação da célula espermática, eventos importantes para que ocorra a fecundação do oócito. Porém, elevadas concentrações destes elementos podem ocasionar estresse oxidativo, acarretando sérios danos ao espermatozoide. A manipulação e a criopreservação causa injúrias à célula espermática, sendo a peroxidação lipídica provocada pela produção anormal das EROs um dos principais responsáveis por tais injúrias. O uso de aditivos, dentre eles os antioxidantes, reduz a produção e ação dos radicais livres sobre a célula espermática, amenizando assim o estresse oxidativo e lesão a membrana celular. Buscando solucionar esse problema, estudos têm avaliado os efeitos da adição da CoQ10 em meio diluidor de sêmen, pois trata-se de um agente lipossolúvel presente na membrana plasmática e que tem como função antioxidante o fornecimento de elétrons ao radical peroxil, interrompendo a reação em cadeia da peroxidação lipídica, principal mecanismo de lesão das células espermáticas. Contudo os resultados ainda são inconsistentes, necessitando de maiores pesquisas nessa área, considerando-se sobretudo, a suscetibilidade individual dos ganhões, melhor forma de utilização e as diferenças entre espécies.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SIKKA, S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v.18, p.325-332, 2006.
- AGARWAL, A.; MAKKER, K.; SHARMA, R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: An update. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.59, p.2-11, 2008.
- AGARWAL, A. et al. Effect of oxidative stress on male reproduction. **World Journal of Men's Health**, v.32, p.1-17, 2014.
- AITKEN, R.J.; LAMBOURNE, S.; GIBB, Z. The John Hughes Memorial Lecture: Aspects of Sperm Physiologyd Oxidative Stress and the Functionality of Stallion Spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.34, p.17–27, 2014.
- AITKEN, R.J.; BUCKINGHAM, D.W.; CARRERAS, A.; IRVINE, D.S. Superoxide dismutase in human sperm suspensions: relationship with cellular composition, oxidative stress, and sperm function. *Free Radical Biology and Medicine*, v.21, p.495- 504, 1996.
- AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction Fertility Development**, v.7, p.659-668, 1995.
- AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.81, p.459-469, 1988.
- ALLEVA, R. et al. The protective role of ubiquinol-10 against formation of lipid hydroperoxides in human seminal fluid. **Molecular Aspects of Medicine**, v.18 (Supplement), p.221-228, 1997.
- ALRAWAIQ, N.S.; ABDULLAH, A. A review of flavonoid quercetin: metabolism, bioactivity and antioxidant properties. **International Journal of PharmTech Research**, v.6, p.933-941, 2014.
- ANDRADE, E.R et al. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, p.79-85, 2010.
- ANDREYEV, A.Y.; KUSHNAREVA, Y.E.; STARKOV, A.A. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. **Biochemistry**, v.70, p.200-214, 2005.
- ARAUJO, E.A.B. **Efeito da adição de butil-hidroxitolueno nos meios de refrigeração e congelamento sobre a viabilidade espermática de equinos**. 2016. 60p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Programa de Pós-

graduação em Biotecnologia Animal – Universidade Estadual Paulista, campus de Botucatu, São Paulo.

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

AURICH, C.; SEEBER, P.; MÜLLER-SCHLÖSSER, F. Comparison of Different Extenders with Defined Protein Composition for Storage of Stallion Spermatozoa at 5°C. **Reproduction of Domestic Animals**, v.42, p.445-448, 2007.

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

BALL, B.A. Oxidative stress in sperm. In: McCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. **Equine Reproduction**. 2. ed. West Sussex: Wiley-Blackwell, 2011, cap.98, v.1. p.991-995.

BARBOSA, K.B.F.et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v.23, n.4, p.629-643, 2010.

BAUMBER, J. et al. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.24, p.621-628, 2003.

BENTINGER, M.; BRISMAR, K.; DALLNER, G. The antioxidant role of coenzyme Q. **Mitochondrion**, v.7S, p.41-50, 2007.

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

BHAGAVAN, H.N.; CHOPRA, R.K. Plasma coenzyme Q10 response to oral ingestion of coenzyme Q10 formulation. **Mitochondrion**, v.7, p.72-88, 2007.

BLOTTNER, S. et al. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. **Animal Reproduction Science** v.65 , p.75–88, 2001.

BRITO, L.F.C. Evaluation of stallion sperm morphology. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v.6, p.249-264, 2007.

BUCAK, M.N.; SARIÖZKAN, S.; TUNCER, P.B.; SAKIN, F.; ATEŞŞAHİN, A.; KULAKSIZ, R.; ÇEVİK, M. The effect of antioxidants on post-thawed Angora goat (*Capra hircus ancyrensis*) spermparameters, lipid peroxidation and antioxidant activities. **Small Ruminants Research**, v.89, p.24-30, 2010.

BURNAUGH, L.; SABEUR, K.; BALL, B.A. Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium. **Theriogenology**, v.67, p.580- 589, 2007.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I.C.F.R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v.51, p.15-25, 2013.

CELEGHINI, E.C.C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozóides utilizando sondas fluorescentes**. 2005. 186p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. Glicólise. In: **Bioquímica Ilustrada**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 534 p.

CHAVES-SILVA L.F.M. **Redução do estresse oxidativo em sêmen equino a partir da adição da quercetina nos diluentes de refrigeração e congelação**. 2015. 91p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Animal – Universidade Estadual Paulista, campus de Botucatu, São Paulo.

COCUZZA, M. et al. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. **International Brazilian Journal of Urology**, v.33, n.5, p.603-621, 2007.

CONTRI, A. et al. Effect of semen preparation on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa. **Theriogenology**, v.74, p.424-435, 2010.

COVIAN, R.; ZWICKER, K.; ROTSAERT, F. A.; TRUMPOWER, B. L. Asymmetric and Redox-specific Binding of Quinone and Quinol at Center N of the Dimeric Yeast Cytochrome *bc1* Complex. **Journal Biological Chemistry**, v. 282, n. 33, p. 24198-24208, 2007.

DATTA, U. et al. Developments of a new method to preserve caprine cauda epididymal spermatozoa *in-situ* at – 10°C with electrolyte free medium. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.26, n.8, p.467-473, 2009.

DONNELLY, E.T. et al. Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. **Human Reproduction**, v.15, p.1552-1561, 2000.

FENICHEL, P. Acrosomal function and sperm fertilizing ability. In: FENICHEL, P.; PARINAUD, J., **Human Sperm Acrosome Reaction**. Colloque INSERM, 1995, v. 236, p. 277–285.

- FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R. et al. Catalase supplementation on thawed bull spermatozoa abolishes the detrimental and DNA integrity. **International Journal of Andrology**, v.32, n.4, p.353-359, 2008.
- FERRAMOSCA, A.; ZARA, V. Bioenergetics of mammalian sperm capacitation. **Biomed Research International**, p.1-8, 2014.
- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, 61-68, 1997.
- FERREIRA, J.C.P. **Avaliação subjetiva e computadorizada do movimento espermático pós-descongelção do sêmen equino**. 2000. 93p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.
- FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v.408, p.239-247, 2000.
- FORD, W.C. - Regulation of sperm function by reactive oxygen species. **Human Reproduction**, v.5, p.387-399, 2004.
- GANDINI, L. et al. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. **Human Reproduction**, v.15, p.830-839, 2000.
- GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. **Espermatozóide e plasma seminal**. In: HAFEZ, E.S.E. Reprodução Animal. São Paulo: Manole, 1995. cap.7, p.167-190.
- GENOVA, M.L.; LENA Z, G. New developments on the functions of coenzyme Q in mitochondria. **BioFactors**, v.37, n.5, p.330-354, 2011.
- GHARAGOZLOO, P.; AITKEN, R.J. The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. **Human Reproduction**, v.26, n.7, p.1628-1640, 2011.
- GIBB, Z.; LAMBOURNE, S.R.; AITKEN, R.J. The paradoxical relationship between stallion fertility and oxidative stress. **Biology of Reproduction**, v.91, 1-10, 2014.
- GRAHAM, E.F.; SCHMEHL, M.K.L.; NELSON, D.S. Problems with laboratory assays. **Proceedings of the eighth technical conference on artificial insemination and reproduction**, p. 1-8, 1980.
- GRANOLLERS, G.L. et al. Efecto del tratamiento con vitaminas, L-carnitina y coenzima Q 10 en el índice de vacuolización y la fragmentación espermática en pacientes de fecundación in vitro. **Revista Internacional de Andrología**, v.9, n.4, p.154-159, 2011.
- GRAVANCE, C.G. et al. Fluorescent probes and flow cytometry to assess rat sperm integrity and mitochondrial function. **Reproductive Toxicology**, v.15, p.5-10, 2001.

- GREEN, K.; BRAND, M.D.; MURPHY, M.P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, v.53, suppl.1, p.110-118, 2004.
- GUALTIERI, R.; BARBATO, V.; FIORENTINO, I.; BRAUN, S.; LONGOBARDI, S.; TALEVI, R. Treatment of bovine spermatozoa with antioxidants improves embryo production in vitro. **Human Reproduction**, v.28, p.78–9, 2014.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. New York: Oxford University, ed.3, p.936, 1999.
- HO, H. C.; SUAREZ, S. S. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. **Reproduction**, v.122, p.519-526, 2001.
- IMAI, H.; NAKAGAWA, Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radical Biology and Medicine*, v.34, p.145–169, 2003.
- INAGAKI, M. et al.. Purification and quantification of lactoferrin in equine seminal plasma. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v.64, n.1, p.75-77, 2002.
- JASKO, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **Ars Veterinária**, v.10, n.2, p.156-165, 1994.
- KASIMANICKAM, R.; PELZER, K.D.; KASIMANICKAM, V.; SWECKER, W.S.; THATCHER, C.D. Association of classical semen parameters, sperm DNA fragmentation index, lipid peroxidation and antioxidant enzymatic activity of semen in ram-lambs. **Theriogenology**, v.65, p.1407-1421, 2006.
- KAWAKAMI, E. et al. Superoxide dismutase and catalase activities in the seminal plasma of normozoospermic and asthenozoospermic Beagles. **Journal of Veterinary Medicine Science**, v.69, p.133-136, 2007.
- KENNEY, R.M. et al. Associations of sperm chromatin structure, motility and morphology of ejaculated sperm, and seasonal pregnancy rate. In: **Proceedings of the VIth International Symposium on Equine Reproduction**, Caxamby, p. 161–162, 1994.
- KIRK, E.S. **Flow cytometric evaluation of stallion sperm**. 2001. 131p. (Dissertação), Colorado State University. Fort Collins, 2001.
- KOURY, J.C.; DONANGELO, C.M. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. **Revista de Nutrição**, v.16, n.4, p.433-441, 2003.
- KUMAR, A.; KAUR, H.; DEVI,P.; MOHAN, V. Role of coenzyme Q10 (CoQ10) in cardiac disease, hypertension and Meniere-like syndrome. **Pharmacology & Therapeutics**, v.124, p.259-268, 2009.

- LAMBERT, A.J.; BRAND, M.D. Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). **The Journal of Biological Chemistry**, v.279, p.39414-39420, 2004.
- LENZI, A. et al. Polyunsaturated fatty acids of germ cell membranes, glutathione and blutathione-dependent enzyme-PHGPx: from basic to clinic. **Contraception**, v.65, p.301-304, 2002.
- LENZI, A. et al.. Lipoperoxidation damage of spermatozoa polyunsaturated fatty acids (PUFA): scavenger mechanisms and possible scavenger therapies. **Frontiers in Bioscience**, v.5, p.1-15, 2000.
- LEWIN, A.; LAVON, H. The effect of coenzyme Q10 on sperm motility and function. **Molecular Aspects Medicine**, v.18, p.213-219, 1997.
- LIMA, E.S.; ABDALLA, D.S.P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciência Farmacêutica**, v.37, n.3, p.293-303, 2001.
- LUZ, H.K.M. et al. Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, n.2, p.956-969, 2011.
- MAIA, M.S.; BICUDO, S.D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.4, p.183-193, 2009.
- MATA-CAMPUZANO, M. et al. Effect of several antioxidants on thawed ram spermatozoa submitted a 37 °C up to 4 h. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.907-914, 2012.
- MAXWELL, W.M.C.; WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v.42, p.55- 65, 1996.
- MISRO, M.M.; CHOUDHURY, L.; UPRETI, K.; GAUTAM, D.; CHAKI, S.P.; MAHAJAN, A.S.; BABBAR, R. Use of hydrogen peroxide to assess the sperm susceptibility to oxidative streee in subjects presenting a normal semen profile. **International Journal Andrology**, v.27, p.82-87, 2004.
- MOORE, I.; SQUIRES, E.L.; GRAHAM, J.K. Effect of seminal plasma on cryopreservation of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.63, p.2372-2381, 2005.
- MORILLO-RODRÍGUEZ, A. et al. Consequences of butylated hydroxytoluene in the freezing extender on post-thaw characteristics of stallion spermatozoa in vitro. **Andrologia**, v.44, p.688-695, 2012.

- NADJARZADEH, A. et al. Effect of coenzyme Q10 supplementation on antioxidant enzymes activity and oxidative stress of seminal plasma: a double-blind randomized clinical trial. **Andrologia**, v.46, n.2, p.177-183, 2012
- NEAGU, V.R. et al. Determination of glutation peroxidase and superoxide dismutase activities in canine seminal plasma and its relation with sperm quality and lipid peroxidation post thaw. **Theriogenology**, v.75, p.10-16, 2011.
- NEILD, D.M. et a. Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen thawed stallion spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v.72, p.230-238, 2005.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios da Bioenergética. In: **Lehninger Princípios da Bioquímica**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2014, p.1298.
- NICHI, M. **Sistema de proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídeos seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de Dourados, MS**. 2003. 103p. (Dissertação) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária – Universidade de São Paulo, São Paulo.
- NOHL, H.; GILLE, L.; KOZLOV, A. V. Antioxidant-derived prooxidant formation from ubiquinol. **Free Radical Biology and Medicine**, v.25, p.666-675, 1998.
- NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology and Medicine**, v.31, n.11, p.1287-1312, 2001.
- O'FLAHERTY, C. M.; BEORLEGUI, N. B.; BECONI, M. T. Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. **Theriogenology**, v.52, p.289-301, 1999.
- OEHNINGER, S. DURU, N.K., SRISOMBUT, C. Assessment of sperm cryodamage e strategies to improve outcome. **Molecular and cellular endocrinology**, v.169, p.3-10, 2000.
- OGNJANOVIĆ, B. I. et al. Cadmium-induced lipid peroxidation and changes in antioxidant defense system in the rat testes: Protective role of coenzyme Q 10 and Vitamin E. **Reproductive Toxicology**, v.29, n.2, p.191-197, 2010.
- PATEL, S.R.; SIGMAN, M. Antioxidant therapy in male infertility. **Urologic Clinics of North America**, v.35, p.319-330, 2008.

- PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. Cryopreservation of semen. In:McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, cap.83, p.769-789, 1992.
- QUINTERO-MORENO, A.; RIGAU, T.; RODRÍGUEZ-GIL, J. Regression analyses and motile sperm subpopulation structure study as improving tools in boar semen quality analysis. **Theriogenology** v.61, p.673–690, 2004.
- RAHA, S.; ROBINSON, B.H. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. **Trends in Biochemical Sciences**, v.25, p.502-508, 2000.
- REDDY, N.S.S.; MOHANARAO, G.J.; ATREJA, S.K. Effects of adding taurine and trehalose to a tris-based egg yolk extender on buffalo (*Bubalua bubalis*) sperm quality following cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v.119, p.183-190, 2010.
- REPETTO, M. G.; FERRAROTTI, N. F; BOVERIS, A. The involvement of transition metal ions on iron-dependent lipid peroxidation. **Archives of Toxicology**, v.84, p.255-262, 2010.
- SARASTE, M. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. **Science**, v.283, p.1488-1492, 1999.
- SHANNON, P.; CURSON, B. Toxic effect and action of dead sperm on diluted bovine semen. **Journal of Dairy Science**, v. 55, n. 5, p. 614-620, 1972.
- SIES, H. Oxidative stress: Oxidant and antioxidant. **Experimental Physiology**, v.82, p.291-295, 1997.
- SIKKA, S. C. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. **Current Medical Chemistry**, v.8, p.851-862, 2001.
- SILVA, S.V.; GUERRA, M.M.P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.4, p.370-384, 2011.
- SMEITINK, J.A.M.; SENGERS, R.; TRIJBELS, F.; VAN DEN HEUVEL, J. Human NADH: ubiquinone oxidoreductase. **Journal Bioenergetics and Biomembranes**, v.33, p.259-266. 2001.
- SOUZA, J.D.S.; FERREIRA, W.M. O papel da vitamina E na nutrição e reprodução animal – Meios de defesa contra os radicais livres. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.4, n.3, p.456-461, 2007.
- SQUIRES, E.L. et al. Cooled and frozen stallion semen. **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory**, n.9, 1999.

- TALEVI, R. et al. Protective effects of in vitro treatment with zinc, d-aspartate and coenzyme Q10 on human sperm motility, lipid peroxidation and DNA fragmentation. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.11, n.81, p.1-10, 2013.
- THOMAS, A.D.; MEYERS, S.A.; BALL, B.A. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. **Theriogenology** v.65, p.1531-50, 2006.
- TRUMPOWER, B. L. The Protonmotive Q Cycle. **Journal Biological Chemistry**, v.265, n.20, p.11409-11412, 1990.
- TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **Journal of Physiology**, v.552, n.2, p.335-344, 2003.
- TURUNEN, M.; OLSSON, J.; DALLNER, G. Metabolism and function of coenzyme Q. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1660, p.171-199, 2004.
- VALENÇA, R.M.B; GUERRA, M.M.P. Espécies reativas ao oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.1, p.47-53, 2007.
- VARNER, D.; JOHNSON, L. From a Sperm's View – Revisiting Our Perception of This Intriguing Cell. **AEEP Proceedings**, v.53, p.104-177, 2007.
- VARNER, D.D.; GIBB, Z.; AITKEN, R.J. Stallion fertility: a focus on the spermatozoon. **Equine Veterinary Journal**, v.47, n.1, p.16-24, 2014.
- VENDITTI, P.; DI STEFANO, L.; DI MEO, S. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. **Mitochondrion**, v.13, p.71-82, 2013.
- VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.23- 53, 2000
- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 871-91, 1995.
- WRIGHT, J.S.; JOHNSON, E.R.; DILABIO, G.A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. **Journal of the American Chemical Society**, v.123, p.1173-1183, 2001.
- YOUSEFIAN I.; ZARE-SHAHNEH, A.; MAHDI ZHANDI, M. The effect of Coenzyme Q10 and α -Tocopherol in skim milk-based extender for preservation of Caspian stallion. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.34, p.949-954, 2014.

HIPÓTESE

A introdução da Coenzima Q10, com função antioxidante, aos meios diluentes de centrifugação e/ou congelação pode reduzir os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio às células espermáticas durante o processo de congelação do sêmen equino.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a melhor concentração da CoQ10, no diluente de centrifugação ou congelação, capaz de promover manutenção da cinética e viabilidade espermática, durante a criopreservação.
- Determinar o melhor momento para adição da CoQ10, pré ou pós-centrifugação.
- Avaliar a resposta da inclusão da CoQ10 aos meios diluentes de centrifugação ou congelação, no ejaculado de garanhões resistentes e sensíveis a congelação.

CAPÍTULO 2

1 Artigo redigido segundo as normas da Theriogenology, ISSN 0093-691X, ranqueada
2 como A2 pelo QUALIS – CAPES de 2015.
3 <https://www.elsevier.com/journals/theriogenology/0093-691x/guide-for-authors>
4

5 **AÇÃO DA COENZIMA Q10 SOBRE A VIABILIDADE ESPERMÁTICA DE** 6 **GARANHÕES RESISTENTES OU SENSÍVEIS À CONGELAÇÃO**

7
8
9 João A. M. Carneiro, Rafael dos S. Bandeira, Verônica F. da C. Scheeren, Bruno R.
10 Avanzi, Jefferson V. A. Diniz, Luciana F. S. Maciel, Gabriela A. Campos, Camila de P.
11 Freitas-Dell'Aqua, Marco A. Alvarenga, Frederico O. Papa, José A. Dell'Aqua Junior
12

13 Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – Universidade Estadual Paulista,
14 Botucatu, SP, Brasil.
15
16

17 **Resumo**

18 O objetivo deste estudo foi avaliar a ação da coenzima Q10 (CoQ10) no espermatozoide
19 de garanhões resistentes (RC) e sensíveis (SC) a congelação. Cada ejaculado (n=24) foi
20 dividido em nove tratamentos e submetido à congelação, sendo a CoQ10 adicionada ao
21 diluente de centrifugação, nas concentrações de 25 µmol/L (CE25), 50 µmol/L (CE50),
22 75 µmol/L (CE75) e 100 µmol/L (CE100), ou ao de congelação nas mesmas
23 concentrações, 25 µmol/L (FE25), 50 µmol/L (FE50), 75 µmol/L (FE75) e 100 µmol/L
24 (FE100). No grupo controle não houve adição da CoQ10 em nenhum dos meios diluentes.
25 O processo de descongelação foi realizado à 37°C/30 segundos (T0) e, para avaliação
26 após estresse térmico, 37°C/30 minutos (T30). Posteriormente, as células espermáticas
27 foram avaliadas quanto a cinética, integridade da membrana plasmática (IMP),
28 desestabilização da membrana (NCAP), produção de espécies reativas ao oxigênio (H₂O₂
29 e O₂⁻), atividade mitocondrial e peroxidação lipídica. De acordo com os resultados, não
30 houve diferença significativa entre os grupos, tanto no momento T0 quanto no momento
31 T30, para os garanhões classificados como RC (p>0,05), com exceção da peroxidação
32 lipídica, que em ambos os momentos, os grupos tratados apresentaram valores menores
33 quando comparados ao controle (p<0,05). Já para os animais classificados como SC,
34 houve uma superioridade das células espermáticas tratadas com a CoQ10 (p<0,05), com
35 exceção da concentração de O₂⁻ e potencial mitocondrial no T0, em que não apresentaram

36 diferença entre os grupos ($p>0,05$). As células espermáticas do grupo CE75 se mostraram
37 superiores aos parâmetros avaliados em relação aos demais grupos. Podemos concluir
38 que a CoQ10 promove uma diminuição do estresse oxidativo e maior viabilidade ao
39 espermatozoide de garanhões sensíveis ao processo de congelação espermática.

40

41 Palavras-Chave: antioxidante, sêmen, criopreservação, equino.

42

43 **1. Introdução**

44 A congelação de sêmen é uma biotecnologia que possui destaque na reprodução
45 equina, uma vez que possibilita preservar o material genético do animal por um tempo
46 ilimitado, além de minimizar a propagação de doenças e eliminar barreiras geográficas
47 [1].

48 Diferente de outras espécies, a seleção genética na espécie equina é baseada
49 apenas em suas características fenotípicas e performance atlética, multiplicando o
50 material genético de garanhões com sêmen sensível à criopreservação [2,3]. Porém, o
51 processo de congelação de sêmen causa injúrias à célula espermática, sendo a produção
52 anormal de espécies reativas de oxigênio ocasionada pela peroxidação lipídica da
53 membrana espermática, um dos principais responsáveis por tais injúrias [4].

54 Diversos estudos adicionaram antioxidantes aos meios diluidores na tentativa de
55 neutralizar os efeitos das espécies reativas ao oxigênio (EROs), uma vez que a
56 manipulação, o armazenamento, a refrigeração e a congelação do sêmen resultam em
57 aumento dos seus níveis [5].

58 Dentre as várias substâncias com função antioxidante citadas na literatura, a
59 CoQ10 ainda não foi testada no meio diluidor para criopreservação do sêmen de
60 garanhões. É conhecida como único lipídeo endogenamente sintetizado que apresenta
61 função redox, um agente lipossolúvel promotor de energia, cuja principal função é o
62 transporte de elétrons e prótons levando à síntese de adenosina trifosfato (ATP) na
63 membrana mitocondrial interna, pela cadeia de transporte de elétrons, sendo encontrada
64 em todas as membranas celulares de mamíferos [6-8].

65 A CoQ10 atua como um potente antioxidante em diversos sistemas biológicos,
66 como lipoproteínas e membranas, protegendo-os contra a oxidação, inibindo a formação
67 de hidroperóxidos e, conseqüentemente, prevenindo a peroxidação lipídica [8-10].

68 Diante disto, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação de diferentes concentrações
69 da CoQ10 no espermatozoide de garanhões RC e sensíveis SC a congelação, assim como
70 a sua melhor utilização, se adicionado ao diluente de centrifugação ou de congelação.

71

72 **2. Material e métodos**

73

74 **2.1. Reagentes**

75 Todos os reagentes utilizados no estudo foram do mais alto grau de pureza e
76 adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

77 **2.2. Aspectos éticos**

78 Os aspectos éticos recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação
79 Animal (COBEA) foram considerados em cada etapa desse estudo, tendo sido aprovado
80 pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Faculdade de Medicina
81 Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, sob protocolo nº 89/2016.

82

83 **2.3. Animais e colheita do sêmen**

84 Foram utilizados 2 ejaculados de 20 garanhões das raças Mangalarga Marchador,
85 Quarto de Milha e Puro Sangue Inglês, com idade variando entre 5 e 20 anos, localizados
86 no município de Bauru, Estado de São Paulo – Brasil (22° 18' 55" S, 49° 3' 41" O). Os
87 animais foram mantidos em estábulos e receberam feno, ração e água *ad libitum*.

88 A colheita do sêmen foi realizada utilizando vagina artificial (modelo
89 Botupharma, Botucatu, SP, Brasil), e o ejaculado filtrado para retirada da fração gel. A
90 concentração espermática foi determinada pela contagem de células na câmara de
91 Neubauer, na diluição de 1:20 em água destilada.

92

93 **2.4. Congelação e descongelação do sêmen**

94 Após a determinação da concentração espermática, as amostras destinadas à
95 congelação foram processadas realizando-se a diluição prévia do sêmen na proporção de
96 50×10^6 espermatozoides móveis por mL, em meio diluente à base de leite desnatado
97 (Botu-Sêmen[®], Botupharma, Botucatu, SP, Brasil), adicionado ou não da CoQ10. Logo
98 após, as amostras foram centrifugadas a 600g durante 10 minutos, o sobrenadante
99 desprezado e o pellet ressuspendido em diluente de congelação a base de gema de ovo
100 (Botu-Crio[®], Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) adicionado ou não da coenzima Q10, na

101 concentração de 200×10^6 espermatozoides móveis por mL. Posteriormente, as amostras
102 foram refrigeradas a 5°C por 20 minutos em refrigerador com temperatura controlada
103 (Minitub do Brasil Ltda, Porto Alegre, RS, Brasil). A seguir, as palhetas foram colocadas
104 a 6 cm acima do nível do nitrogênio líquido mantido em caixa de poliestireno, recebendo
105 o vapor por 20 minutos, e subsequentemente submergidas no nitrogênio líquido e
106 armazenadas em botijão [11].

107 O processo de descongelação foi realizado à $37^\circ\text{C}/30$ segundos (T0) e, para
108 avaliação após estresse térmico, $37^\circ\text{C}/30$ minutos (T30). Após a descongelação o sêmen
109 foi transferido para um tubo plástico de 1,5 mL e mantidos a 37°C durante a avaliação.

110

111 **2.5. Delineamento experimental**

112 Cada ejaculado foi dividido em 9 tratamentos e submetido ao processo de
113 congelação, sendo a CoQ10 adicionada ao diluente de centrifugação, nas concentrações
114 de $25 \mu\text{mol/L}$ (CE25), $50 \mu\text{mol/L}$ (CE50), $75 \mu\text{mol/L}$ (CE75) e $100 \mu\text{mol/L}$ (CE100), ou
115 ao de congelação nas mesmas concentrações, $25 \mu\text{mol/L}$ (FE25), $50 \mu\text{mol/L}$ (FE50), 75
116 $\mu\text{mol/L}$ (FE75) e $100 \mu\text{mol/L}$ (FE100). Quando a coenzima foi adicionada ao diluente de
117 centrifugação não foi adicionada ao de congelação e quando adicionada ao diluente de
118 congelação não foi adicionada ao de centrifugação, com exceção do grupo controle que
119 não houve adição da CoQ10 em nenhum dos meios diluentes.

120

121 **2.6. Classificação dos animais**

122 Os animais foram classificados em RC ou SC a partir do decréscimo percentual
123 de motilidade total entre o ejaculado no momento da colheita e avaliação após
124 descongelação (T0) no grupo controle, metodologia adaptada de Hartwig et al. [13]. Os
125 garanhões que apresentaram decréscimo $\leq 25\%$ da motilidade total foram considerados
126 RC e os animais que apresentaram percentual de perda $\geq 40\%$ da motilidade total foram
127 considerados SC. Dos 20 animais, 7 foram considerados RC, 5 garanhões SC e 8 não se
128 enquadraram nos parâmetros determinados e foram descartados.

129

130 **2.7. Análise espermática**

131

132 **2.7.1. Cinética espermática**

133 Foram avaliados os parâmetros de cinética espermática pelo sistema
134 computadorizado (CASA - *Computer Assisted Sperm Analysis*, HTM-IVOS 12, Hamilton

135 Thorne Research, Beverly, MA) mensurando 5 campos aleatórios. Para cada amostra foi
 136 avaliada a porcentagem de motilidade espermática total (MT), motilidade espermática
 137 progressiva (MP) e espermatozoides com movimento rápido (RAP). As configurações do
 138 CASA usado nesse experimento estão descritas na Tabela 1.

139

140 Tabela 1 – Ajuste do HTMA – IVOS – 10 para as realizações das análises seminais em equídeos.

Characteristic	Setup
Image capture (frames per sec)	60 Hz
Image capture (No. of frames)	30
Cell detection (min contrast)	30
Cell detection (min cell size)	30 pixels
Defaults (cell size)	5 pixels
Defaults (cell intensity)	40
Progressive cells (VAP)	70.0 μ /s
Progressive cells (STR)	80.0%
Slow cells (static: VAP cutoff)	30 μ /s
Slow cells (static: VSL cutoff)	20 μ /s
Illumination: intensity	3,600
Illumination: photometer	125
Video source (dark field)	60 Hz
Static intensity gates (min and max)	0.48 and 1.45
Static elongation gates (min and max)	0 and 97
Chamber type	Makler ¹
Temperature	38° C
Field selection	Automatic

141 ¹Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, USA (chamber depth 10.0 μ m, stage position
 142 14.3 mm)

143

144 2.7.2. Avaliação por citometria de fluxo

145 Para as análises de citometria de fluxo foi utilizado o equipamento LSR Fortessa
 146 (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) equipado com lasers azul (488-nm, 100
 147 mW), vermelho (640-nm, 40 mW) e violeta (405-nm, 100 mW). Após a análise, os dados
 148 foram avaliados pelo software do mesmo fabricante BD FACSDiva™ v6.1.

149 Para todos os ensaios as amostras foram diluídas em TALP-PVA (100mM NaCl,
 150 3,1mM KCl, 25,0mM NaHCO₃, 0,3mM NaH₂PO₄, 21,6mM DL-lactato de sódio
 151 60%, 2,0mM CaCl₂, 0,4mM MgCl₂, 10,0mM Hepes-livre de ácido, 1,0mM piruvato de
 152 sódio, 1,0mg/mL álcool polivinil-PVA e 25 μ g/mL gentamicina) na concentração de
 153 5x10⁶ espermatozoides/ml, acrescido de Hoescht 33342 (100 μ g/mL) para descarte das
 154 partículas não celulares [14].

155 Autofluorescência e controles de cada fluorocromo foram adquiridos para ajuste
 156 de sobreposição de onda e compensação utilizando-se a matriz de compensação do

157 próprio software. Os dados foram gerados utilizando-se gráficos *dotplot* incluindo eixo
158 <0t (bi-exponencial) tornando todas os eventos visíveis e propriamente compensados. No
159 mínimo 10.000 células por amostra foram analisadas.

160 Para a avaliação da produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) intracelular
161 utilizou-se dihydrorhodamine 123 (DHR, D23806 – Life Technologies, São Paulo, SP,
162 Brasil), associada com iodeto de propídio. Uma alíquota de 500µL da solução de sêmen
163 diluído em TALP-PVA foi acrescida de 1.5µM de iodeto de propídio (diluído em TALP-
164 PVA) e 1µM de DHR (diluído em DMSO) na solução final. A mistura foi incubada por
165 20min a 37°C ao abrigo da luz.

166 Para avaliação do potencial mitocondrial e produção de superóxido (O₂⁻)
167 intracelular foi utilizada a associação Yo-Pro® (YP, Y3603 – Life Technologies;
168 marcação para célula com desestabilização de membrana plasmática), MitoStatus Red
169 (MST; potencial mitocondrial) e Dihydroethidium (DHE, D23107 – Life Technologies;
170 geração de ânion superóxido intracitoplasmático). Assim, em 500µL de sêmen diluído
171 em TALP-PVA foi adicionado 25nM de YP, 20µM de MST e 2µM de DHE, incubados
172 20min a 37°C.

173 A peroxidação lipídica foi avaliada utilizando a sonda C11-BODYPY (D-3861;
174 Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA). Uma amostra de 489,5µL de sêmen diluído em
175 meio TALP-PVA em uma concentração de 2x10⁶ espermatozoides/mL foi acrescida de
176 0,5µL da sonda C11BODIPY581/591 (1mg/mL), 5µL de iodeto de propídio (50µg/mL),
177 5µL de Hoescht 33342 (100µg/mL) e a mistura foi incubada por 30 minutos à 37°C. Após
178 a incubação as amostras foram lavadas 2 vezes a 300g/5min e o pellet ressuspenso para
179 500µL e analisados por citometria de fluxo [15].

180

181 **2.8. Análise estatística**

182 As análises foram realizadas pelo software Instat 5.0 (GraphPad Software Inc,
183 USA). Para avaliação da normalidade das variáveis foi efetuado o teste de Kolmogorov-
184 Smirnov. Todas as análises, tanto da cinética espermática como das características
185 avaliadas por citometria de fluxo, apresentaram distribuição anormal. Assim sendo, foi
186 utilizado o teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste Dunn. Diferenças significativas foram
187 consideradas quando $p \leq 0,05$.

188

189

190

191 **3. Resultados**

192 Os resultados obtidos neste experimento foram apresentados nas tabelas 2, 3, 4 e 5.

193 Houve diferença para análise de peroxidação lipídica entre o grupo controle e o
194 tratado, tanto para o momento T0 quanto para o momento T30, nos espermatozoides dos
195 garanhões classificados como RC ($p \leq 0,05$). Para esta análise, o grupo controle apresentou
196 valores superiores quando comparados ao tratado, com exceção do grupo CE25 no T0 e
197 CE25 e CE75 no T30, que apresentaram valores intermediários (Tabela 2 e 3).

198 Já para as células espermáticas dos animais classificados como SC, no momento T0
199 foi observada diferença entre os grupos controle e tratado para as avaliações de MT, MP
200 (CE75), RAP (CE25, CE50, CE75 e CE100), IMP (CE25, CE75 e FE50),
201 desestabilização de membrana (NCAP) (todos os CE e FE), peroxidação lipídica (CE25,
202 CE50, CE75 e FE50) e concentração de H_2O_2 intracelular (CE75, CE100, FE25, FE50,
203 FE75, FE100), sendo o grupo tratado significativamente melhor que o grupo controle
204 ($p \leq 0,05$) (Tabela 4).

205 Após submeter as células espermáticas ao estresse térmico por 30 minutos (T30),
206 os espermatozoides tratados apresentaram melhores resultados que o grupo controle para
207 as avaliações de MT, MP e NCAP (todos os CE e FE), RAP (CE25, CE50, CE75 e
208 CE100), IMP (CE25, CE50, CE75, CE100, FE25 e FE75), peroxidação lipídica (CE25,
209 CE50, CE75, CE100, FE25 e FE50), concentração de H_2O_2 (CE75 e CE100) e potencial
210 mitocondrial (CE75) ($p \leq 0,05$) (Tabela 5).

211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230

Tabela 2. Média \pm erro padrão dos parâmetros da cinética espermática, integridade de membrana e das avaliações por citometria de fluxo nos tratamentos Controle e as diferentes concentrações da CoQ10 adicionados aos diluentes de centrifugação (CE) ou congelamento (FE), avaliados pós-descongelamento (T0) dos ganhões resistentes a congelamento.

RESISTENTES A CONGELAMENTO (T0)									
	CT	CE25	CE50	CE75	CE100	FE25	FE50	FE75	FE100
MT (%)	71 \pm 2,5	67 \pm 3,4	67 \pm 3,2	71 \pm 4,4	66 \pm 3,1	65 \pm 2,3	68 \pm 2,5	68 \pm 1,6	70 \pm 0,8
MP (%)	34 \pm 2,5	32 \pm 3,2	34 \pm 3,1	36 \pm 3,7	34 \pm 3,2	38 \pm 2,3	33 \pm 2,9	34 \pm 2,6	33 \pm 2,0
RAP (%)	52 \pm 5,1	50 \pm 3,7	53 \pm 3,8	58 \pm 5,2	52 \pm 4,0	56 \pm 2,7	53 \pm 3,1	54 \pm 2,4	53 \pm 2,5
IMP (%)	36 \pm 0,3	35 \pm 1,5	34 \pm 0,7	34 \pm 0,9	36 \pm 1,7	37 \pm 0,7	35 \pm 0,8	35 \pm 1,4	34 \pm 0,6
NCAP (%)	32 \pm 0,5	32 \pm 0,8	33 \pm 0,8	36 \pm 1,0	32 \pm 0,5	30 \pm 1,0	32 \pm 0,9	33 \pm 0,7	34 \pm 0,3
PL (%)	62 \pm 7,6 ^b	34 \pm 0,4 ^{ab}	29 \pm 0,1 ^a	25 \pm 0,6 ^a	27 \pm 7,5 ^a	26 \pm 9,4 ^a	26 \pm 6,4 ^a	27 \pm 8,7 ^a	27 \pm 7,2 ^a
O ₂ ⁻ (UA)	9438 \pm 330	10390 \pm 515	10307 \pm 358	10140 \pm 502	10989 \pm 517	10664 \pm 399	9656 \pm 240	9568 \pm 209	10890 \pm 694
H ₂ O ₂ (UA)	8973 \pm 393,2	9769 \pm 600,8	9645 \pm 521,1	8504 \pm 639,5	9481 \pm 543,7	9072 \pm 506,0	9412 \pm 473,4	8027 \pm 430,9	7945 \pm 601,5
PM (UA)	3991 \pm 251	4611 \pm 280	4129 \pm 214	4012 \pm 287	3799 \pm 326	4647 \pm 123	4353 \pm 198	4732 \pm 302	4305 \pm 273

*Valores com sobrescritos diferentes (a, b) na mesma linha diferem significativamente ($p < 0,05$)

CT (sem adição da CoQ10); CE25 (CE + 25 μ mol/L CoQ10); CE50 (CE + 50 μ mol/L CoQ10); CE75 (CE + 75 μ mol/L CoQ10); CE100 (CE + 100 μ mol/L CoQ10);

FE25 (FE + 25 μ mol/L CoQ10); FE50 (FE + 50 μ mol/L CoQ10); FE75 (FE + 75 μ mol/L CoQ10); FE100 (FE + 100 μ mol/L CoQ10).

T0: momento 0 hora pós descongelamento a 37°C por 30 segundos; MT: motilidade espermática total; MP: motilidade espermática progressiva; RAP: espermatozoides com

movimento rápido; IMP: integridade da membrana plasmática; NCAP: espermatozoides não capacitados; PL: peroxidação lipídica; O₂⁻: concentração total de O₂⁻; H₂O₂:

concentração total de H₂O₂; PM: potencial mitocondrial total; UA: unidade arbitrária (n = 14 ejaculados).

231
 232
 233
 234
 235
 236
 237
 238
 239
 240
 241
 242
 243
 244
 245
 246
 247
 248
 249
 250
 251

Tabela 3. Média \pm erro padrão dos parâmetros da cinética espermática, integridade de membrana e das avaliações por citometria de fluxo nos tratamentos Controle e as diferentes concentrações da CoQ10 adicionados aos diluentes de centrifugação (CE) ou congelação (FE), avaliados pós-descongelação (T30) dos garanhões resistentes a congelação.

RESISTENTES A CONGELAÇÃO (T30)									
	CT	CE25	CE50	CE75	CE100	FE25	FE50	FE75	FE100
MT (%)	62 \pm 3,2	59 \pm 3,3	59 \pm 4,1	61 \pm 3,5	60 \pm 3,5	60 \pm 3,6	61 \pm 3,2	63 \pm 3,6	63 \pm 3,1
MP (%)	26 \pm 2,8	24 \pm 2,9	26 \pm 3,4	35 \pm 6,6	26 \pm 3,1	26 \pm 2,9	26 \pm 3,6	29 \pm 3,6	27 \pm 3,2
RAP (%)	45 \pm 4,5	42 \pm 4,2	44 \pm 4,7	46 \pm 4,4	47 \pm 4,0	44 \pm 4,3	44 \pm 4,6	46 \pm 4,8	47 \pm 4,2
IMP (%)	32 \pm 1,2	30 \pm 0,3	31 \pm 0,5	36 \pm 0,5	32 \pm 0,8	31 \pm 0,5	30 \pm 0,4	28 \pm 1,1	29 \pm 1,6
NCAP (%)	30 \pm 1,2	29 \pm 1,0	27 \pm 0,4	32 \pm 1,1	29 \pm 1,1	26 \pm 0,6	27 \pm 0,2	27 \pm 2,7	28 \pm 1,9
PL (%)	82 \pm 1,7 ^b	61 \pm 2,2 ^{ab}	60 \pm 3,9 ^{ab}	44 \pm 5,8 ^a	58 \pm 0,6 ^a	55 \pm 1,1 ^a	53 \pm 1,0 ^a	56 \pm 4,3 ^a	46 \pm 2,8 ^a
O ₂ ⁻ (UA)	9839 \pm 255	9517 \pm 248	10239 \pm 408	9874 \pm 455	9481 \pm 424	9560 \pm 400	9385 \pm 235	9687 \pm 270	10393 \pm 382
H ₂ O ₂ (UA)	9261 \pm 845,3	9881 \pm 693,1	10940 \pm 936,0	9204 \pm 529,5	10113 \pm 958,7	10808 \pm 987,8	8778 \pm 493,0	9548 \pm 634,7	9859 \pm 731,6
PM (UA)	3035 \pm 210	3337 \pm 312	3298 \pm 258	3316 \pm 218	3625 \pm 264	3424 \pm 220	3387 \pm 264	3900 \pm 393	3104 \pm 139

*Valores com sobrescritos diferentes (a, b) na mesma linha diferem significativamente ($p < 0,05$)

CT (sem adição da CoQ10); CE25 (CE + 25 μ mols/L CoQ10); CE50 (CE + 50 μ mols/L CoQ10); CE75 (CE + 75 μ mols/L CoQ10); CE100 (CE + 100 μ mols/L CoQ10);

FE25 (FE + 25 μ mols/L CoQ10); FE50 (FE + 50 μ mols/L CoQ10); FE75 (FE + 75 μ mols/L CoQ10); FE100 (FE + 100 μ mols/L CoQ10).

T0: momento 0 hora pós descongelação a 37°C por 30 segundos; MT: motilidade espermática total; MP: motilidade espermática progressiva; RAP: espermatozoides com movimento rápido; IMP: integridade da membrana plasmática; NCAP: espermatozoides não capacitados; PL: peroxidação lipídica; O₂⁻: concentração total de O₂⁻; H₂O₂: concentração total de H₂O₂; PM: potencial mitocondrial total; UA: unidade arbitrária (n = 14 ejaculados).

252
 253
 254
 255
 256
 257
 258
 259
 260
 261
 262
 263
 264
 265
 266
 267
 268
 269
 270
 271

Tabela 4. Média \pm erro padrão dos parâmetros da cinética espermática, integridade de membrana e das avaliações por citometria de fluxo nos tratamentos Controle e as diferentes concentrações da CoQ10 adicionados aos diluentes de centrifugação (CE) ou congelação (FE), avaliados pós-descongelação (T0) dos ganhões sensíveis a congelação.

	SENSÍVEIS A CONGELAÇÃO (T0)								
	CT	CE25	CE50	CE75	CE100	FE25	FE50	FE75	FE100
MT (%)	35 \pm 3,6 ^b	46 \pm 5,7 ^a	46 \pm 6,8 ^a	51 \pm 2,6 ^a	47 \pm 4,5 ^a	41 \pm 5,3 ^a	44 \pm 6,0 ^a	44 \pm 7,2 ^a	49 \pm 2,3 ^a
MP (%)	15 \pm 2,3 ^b	18 \pm 3,0 ^{ab}	18 \pm 3,5 ^{ab}	22 \pm 2,7 ^a	17 \pm 2,6 ^{ab}	17 \pm 3,0 ^{ab}	18 \pm 3,5 ^{ab}	17 \pm 3,5 ^{ab}	19 \pm 1,8 ^{ab}
RAP (%)	21 \pm 2,9 ^b	31 \pm 4,8 ^a	33 \pm 5,4 ^a	38 \pm 3,3 ^a	35 \pm 3,2 ^a	26 \pm 4,4 ^{ab}	29 \pm 5,1 ^{ab}	28 \pm 5,9 ^{ab}	27 \pm 2,0 ^{ab}
IMP (%)	15 \pm 1,4 ^b	18 \pm 1,9 ^a	15 \pm 1,2 ^b	17 \pm 1,9 ^a	17 \pm 1,6 ^{ab}	16 \pm 2,4 ^b	17 \pm 1,5 ^a	17 \pm 2,3 ^{ab}	14 \pm 1,4 ^b
NCAP (%)	12 \pm 0,9 ^b	21 \pm 0,7 ^a	23 \pm 1,0 ^a	23 \pm 0,9 ^a	21 \pm 0,5 ^a	19 \pm 1,7 ^a	21 \pm 1,2 ^a	20 \pm 1,6 ^a	21 \pm 0,8 ^a
PL (%)	69 \pm 7,6 ^b	31 \pm 0,4 ^a	30 \pm 0,1 ^a	35 \pm 0,6 ^a	61 \pm 7,5 ^{ab}	61 \pm 9,4 ^{ab}	49 \pm 6,4 ^a	57,5 \pm 8,7 ^{ab}	55 \pm 7,2 ^{ab}
O ₂ ⁻ (UA)	8870 \pm 166,9	8793 \pm 144,2	8701 \pm 129,3	8831 \pm 113,7	8882 \pm 145,3	8790 \pm 158,8	8618 \pm 161,8	8643 \pm 127,5	8890 \pm 146,6
H ₂ O ₂ (UA)	9572 \pm 157,8 ^b	9413 \pm 156,6 ^b	9860 \pm 74,9 ^{ab}	10349 \pm 76,1 ^a	10078 \pm 83,0 ^a	10446 \pm 106,3 ^a	10723 \pm 75,1 ^a	10680 \pm 196,1 ^a	10593 \pm 112,5 ^a
PM (UA)	2985 \pm 143,6	2960 \pm 104,8	2889 \pm 138,2	3748 \pm 102,7	3047 \pm 107,3	2862 \pm 113,0	2913 \pm 186,6	3050 \pm 111,4	3083 \pm 187,2

*Valores com sobrescritos diferentes (a, b) na mesma linha diferem significativamente ($p < 0,05$)

CT (sem adição da CoQ10); CE25 (CE + 25 μ mols/L CoQ10); CE50 (CE + 50 μ mols/L CoQ10); CE75 (CE + 75 μ mols/L CoQ10); CE100 (CE + 100 μ mols/L CoQ10);

FE25 (FE + 25 μ mols/L CoQ10); FE50 (FE + 50 μ mols/L CoQ10); FE75 (FE + 75 μ mols/L CoQ10); FE100 (FE + 100 μ mols/L CoQ10).

T0: momento 0 hora pós descongelação a 37°C por 30 segundos; MT: motilidade espermática total; MP: motilidade espermática progressiva; RAP: espermatozoides com movimento rápido; IMP: integridade da membrana plasmática; NCAP: espermatozoides não capacitados; PL: peroxidação lipídica; O₂⁻: concentração total de O₂⁻; H₂O₂: concentração total de H₂O₂; PM: potencial mitocondrial total; UA: unidade arbitrária (n = 10 ejaculados).

272
273
274
275
276
277
278
279

Tabela 5. Média \pm erro padrão dos parâmetros da cinética espermática, integridade de membrana e das avaliações por citometria de fluxo nos tratamentos Controle e as diferentes concentrações da CoQ10 adicionados aos diluentes de centrifugação (CE) ou congelação (FE), avaliados pós-descongelamento (T30) dos ganhões sensíveis a congelamento.

SENSÍVEIS A CONGELAMENTO (T30)									
	CT	CE25	CE50	CE75	CE100	FE25	FE50	FE75	FE100
MT (%)	22 \pm 0,4 ^b	42 \pm 4,9 ^a	39 \pm 1,6 ^a	43 \pm 3,2 ^a	42 \pm 1,0 ^a	40 \pm 5,4 ^a	38 \pm 4,4 ^a	38 \pm 3,9 ^a	36 \pm 2,9 ^a
MP (%)	8 \pm 0,9 ^b	14 \pm 2,3 ^a	11 \pm 0,9 ^a	16 \pm 3,1 ^a	14 \pm 0,4 ^a	14 \pm 2,6 ^a	12 \pm 1,7 ^a	12 \pm 1,9 ^a	12 \pm 1,3 ^a
RAP (%)	11 \pm 0,5 ^b	25 \pm 3,5 ^a	26 \pm 1,4 ^a	27 \pm 5,0 ^a	24 \pm 0,2 ^a	20 \pm 3,8 ^{ab}	18 \pm 2,9 ^{ab}	19 \pm 2,7 ^{ab}	20 \pm 2,0 ^{ab}
IMP (%)	13 \pm 1,2 ^b	17 \pm 1,9 ^a	16 \pm 1,7 ^a	18 \pm 1,8 ^a	17 \pm 1,4 ^a	18 \pm 1,9 ^a	15 \pm 1,7 ^{ab}	18 \pm 2,6 ^a	14 \pm 1,6 ^{ab}
NCAP (%)	9 \pm 0,2 ^b	16 \pm 1,4 ^a	14 \pm 0,9 ^a	15 \pm 1,8 ^a	14 \pm 0,9 ^a	14 \pm 1,7 ^a	14 \pm 1,4 ^a	13 \pm 2,5 ^a	15 \pm 1,6 ^a
PL (%)	82 \pm 1,7 ^b	56 \pm 2,2 ^a	62 \pm 3,9 ^a	62 \pm 5,8 ^a	55 \pm 0,6 ^a	62 \pm 1,1 ^a	51 \pm 1,0 ^a	69 \pm 54,3 ^{ab}	66 \pm 2,8 ^{ab}
O₂⁻ (UA)	8229 \pm 117,	8696 \pm 193,5	8245 \pm 195,4	8024 \pm 107,6	8404 \pm 165,2	8660 \pm 129,9	8803 \pm 135,0	8987 \pm 102,4	8759 \pm 177,3
H₂O₂ (UA)	8470 \pm 178,4 ^b	8725 \pm 177,5 ^b	9822 \pm 213,8 ^{ab}	10680 \pm 236,3 ^a	10966 \pm 72,2 ^a	8849 \pm 240,8 ^b	8870 \pm 155,7 ^b	8924 \pm 242,0 ^b	8842 \pm 239,3 ^b
PM (UA)	2357 \pm 139,7 ^{bc}	1968 \pm 129,5 ^c	2269 \pm 100,5 ^c	4032 \pm 113,3 ^a	2916 \pm 119,7 ^{ab}	2175 \pm 111,4 ^c	2378 \pm 127,7 ^{bc}	2179 \pm 108,5 ^c	2605 \pm 139,0 ^{bc}

280 *Valores com sobrescritos diferentes (a, b) na mesma linha diferem significativamente ($p < 0,05$)
 281 CT (sem adição da CoQ10); CE25 (CE + 25 μ mols/L CoQ10); CE50 (CE + 50 μ mols/L CoQ10); CE75 (CE + 75 μ mols/L CoQ10); CE100 (CE + 100 μ mols/L CoQ10);
 282 FE25 (FE + 25 μ mols/L CoQ10); FE50 (FE + 50 μ mols/L CoQ10); FE75 (FE + 75 μ mols/L CoQ10); FE100 (FE + 100 μ mols/L CoQ10).
 283 T0: momento 0 hora pós descongelamento a 37°C por 30 segundos; MT: motilidade espermática total; MP: motilidade espermática progressiva; RAP: espermatozoides com
 284 movimento rápido; IMP: integridade da membrana plasmática; NCAP: espermatozoides não capacitados; PL: peroxidação lipídica; O₂⁻: concentração total de O₂⁻; H₂O₂:
 285 concentração total de H₂O₂; PM: potencial mitocondrial total; UA: unidade arbitrária (n = 10 ejaculados).
 286
 287
 288

289 4. Discussão

290 Neste estudo, o antioxidante CoQ10 foi adicionado aos diluentes de centrifugação
291 e de congelação do sêmen equino com o objetivo de minimizar os efeitos do estresse
292 oxidativo provocado pelo processo de congelação espermática, assim como avaliar a
293 melhor forma de incorporação desta coenzima no espermatozoide, se adicionada ao
294 diluente de centrifugação ou ao diluente de congelação, utilizando o ejaculado de animais
295 sensíveis (SC) e resistentes à congelação (RC).

296 Os resultados sugerem que os garanhões classificados como RC possuam
297 mecanismos antioxidantes intrínsecos capazes de conter o estresse oxidativo e a
298 peroxidação lipídica provocados pela ação das EROs após o processo de congelação e
299 descongelação espermática. Mecanismos estes que não foram observados nos animais
300 classificados como SC, visto que estes foram dependentes da adição da CoQ10 para
301 manter a qualidade espermática após a descongelação. Os indivíduos considerados SC
302 foram mais beneficiados com a adição da CoQ10 ao diluente, havendo diferenças
303 significativas entre o grupo controle e o tratado para maioria dos parâmetros avaliados,
304 tanto para o momento T0 quanto para T30. Provavelmente estes animais apresentam uma
305 deficiência na produção e reserva de antioxidante celular, que foi amenizada com a adição
306 da CoQ10 aos meios diluentes.

307 A motilidade espermática parece ser um indicador de estresse oxidativo, uma vez
308 que a sua queda é observada antes mesmo do surgimento de qualquer possibilidade de
309 avaliação do estresse oxidativo [16]. Nos animais SC, as células espermáticas que
310 entraram em contato com a CoQ10 apresentaram valores maiores na avaliação da cinética
311 espermática. Este fato pode ser explicado pela função bioenergética da CoQ10, devido ao
312 seu papel no transporte de prótons e elétrons da cadeia de transporte de elétrons da matriz
313 mitocondrial, importante na síntese de ATP [7, 8], uma vez que a cinética espermática
314 requer uma alta demanda energética. Estes resultados são semelhantes a estudos
315 realizados com humanos, em que a incubação de amostras seminais na presença da
316 CoQ10 preservou a motilidade espermática total e progressiva em homens portadores de
317 astenozoospermia [6] e normospérmicos [17]. Resultado igual ao observado em estudo
318 realizado com sêmen criopreservado de touro [18]. Os autores atribuíram os resultados à
319 presença da CoQ10 na matriz mitocondrial, incrementando assim a produção de ATP.
320 Yousefian et al. [19], utilizando sêmen refrigerado equino, observaram uma maior
321 preservação dos parâmetros de motilidade espermática durante a refrigeração do sêmen a
322 5°C por 48 horas, associando a CoQ10 ao α -tocoferol. O espermatozoide equino é

323 dependente da fosforilação oxidativa [19], logo, com o aumento da eficiência metabólica
324 proporcionada pela CoQ10, aumentou também a eficiência da fosforilação oxidativa
325 mitocondrial, trazendo benefícios para motilidade espermática.

326 As células espermáticas dos garanhões possuem uma grande quantidade de ácidos
327 graxos polinsaturados (PUFAs) que confere aos espermatozoides fluidez da membrana e
328 resistência à diminuição acentuada da temperatura [20,21]. Porém, devido a sua estrutura
329 bioquímica, os ácidos graxos da membrana plasmática são fontes de elétrons para os
330 radicais livres, tornando as células espermáticas altamente sensíveis aos efeitos nocivos
331 das EROs, que tem sua produção aumentada durante o processo de criopreservação, sendo
332 responsáveis pelo estresse oxidativo [22]. Neste estudo, foi detectado um efeito benéfico
333 da CoQ10 sobre a IMP das células espermáticas dos animais SC, tanto no momento T0
334 quanto no momento T30, demonstrando que esta coenzima foi eficiente na manutenção
335 da integridade destas células. Este resultado pode ser explicado devido a característica
336 bioquímica da CoQ10, pois ela atua como um excelente agente antioxidante inibindo a
337 formação de hidroperóxidos e assim protegendo a membrana plasmática contra a
338 oxidação [8,10]. Também foi detectado o efeito benéfico da CoQ10 sobre a IMP em
339 estudos realizados com sêmen refrigerado a 5°C por 48 horas em equinos [19,23], em
340 humanos [6,17] e em bovinos [18]. Os autores atribuíram os resultados a capacidade da
341 CoQ10 doar elétrons ao radical peroxil lipídico da membrana plasmática, interrompendo
342 a reação em cadeia da peroxidação.

343 A peroxidação lipídica é determinada por uma sequência de reações desencadeada
344 a partir da ação das OH^\bullet , sequestrando H^+ das PUFAs presentes na bicamada fosfolipídica
345 das membranas, dando origem posteriormente aos radicais alcóxil (RO^\bullet) ou peroxil
346 (ROO^\bullet), que têm a tendência de estabilizar retirando uma molécula de H^+ e um elétron
347 presentes nos fosfolipídeos adjacentes gerando uma reação em cadeia e culminando na
348 desestruturação da membrana plasmática[24]. De acordo com as análises de peroxidação
349 lipídica deste estudo, a CoQ10 foi capaz de diminuir o processo de reação em cadeia, uma
350 vez que os grupos testados apresentaram menores taxas de peroxidação quando
351 comparado ao controle, para ambos os momentos. Porém, apesar do grupo controle
352 possuir maiores taxas de peroxidação lipídica, os animais RC demonstraram possuir
353 mecanismos antioxidantes intrínsecos capazes de conter a reação em cadeia da
354 peroxidação, uma vez que a IMP foi semelhante para ambos os grupos em ambos os
355 momentos. Isto sugere que os antioxidantes endógenos, presentes nos fluidos seminais
356 destes animais, são capazes de estabilizar o radical peroxil de forma eficiente, evitando

357 uma futura lesão da membrana plasmática. O mesmo não ocorreu nos animais
358 classificados como SC, uma vez que os valores de IMP dos espermatozoides tratados com
359 a CoQ10 foram superiores ao grupo controle. Provavelmente, estes animais possuem uma
360 deficiência na produção e/ou armazenamento dos agentes antioxidantes, necessitando de
361 uma suplementação exógena. Estudos realizados em ratos [25] e em equinos [19,23]
362 observaram uma diminuição na taxa de peroxidação lipídica com o uso da CoQ10 e/ou
363 vitamina E. De acordo com os autores, a CoQ10 equilibra o desbalanço entre a ação dos
364 radicais livres e o potencial antioxidante das células. Em humanos [17] e bovinos [18]
365 estudos demonstraram uma diminuição na peroxidação lipídica das células espermáticas
366 associando a CoQ10, zinco e d-aspartato no diluente de congelação. Os autores
367 salientaram o papel da CoQ10 como excelente reparador da ação das EROs nas PUFA
368 da membrana plasmática.

369 O ânion superóxido é gerado principalmente durante a cadeia respiratória
370 mitocondrial e é o precursor da maioria das EROs. Este radical livre ao reagir com o H_2O_2
371 (reação de Haber-Weiss) origina o radical hidroxil, considerado um dos mais potentes
372 agentes oxidantes, sendo capaz de atravessar membranas e reagir com moléculas tais
373 como lipídeos insaturados das membranas e DNA. Com relação a análise da concentração
374 do O_2^- , a CoQ10 não influenciou na produção deste radical em nenhum dos momentos.
375 Este resultado pode ser explicado pelo fato de que a CoQ10 não atua diretamente nas
376 espécies reativas, e sim na fase de iniciação da propagação da peroxidação lipídica,
377 neutralizando os radicais lipídicos após a sua formação [26].

378 O H_2O_2 é formado a partir da dismutação do O_2^- e, por possuir estabilidade em
379 sua estrutura, não é considerado propriamente um radical livre. No entanto, altas
380 concentrações do peróxido de hidrogênio são encontradas em ganhões com alta
381 qualidade seminal, tendo este radical uma correlação positiva com o metabolismo
382 espermático [27].

383 A maior concentração do H_2O_2 nos grupos tratados (CE75 e CE100) com relação
384 ao grupo controle, sugere que a CoQ10 promoveu uma maior proteção da atividade
385 metabólica para os espermatozoides destes grupos nos animais SC. Gibb et al. [27]
386 observaram que os ganhões mais férteis apresentam em seu ejaculado altas
387 concentrações de EROs e, conseqüentemente, maiores níveis de estresse oxidativo. Os
388 mesmos sugerem que a produção do H_2O_2 seja simplesmente um subproduto da alta
389 atividade mitocondrial, apresentando uma correlação positiva entre os níveis de EROs e
390 taxa de fertilidade nos equinos. Em contrapartida, Johannisson et al. [28] relataram uma

391 correlação negativa entre H_2O_2 , motilidade progressiva, integridade da cromatina e
392 fertilidade, sugerindo que as EROs reduzem a fertilidade em equinos.

393 A capacidade do espermatozoide em produzir ATP é indicada pela atividade
394 mitocondrial e está positivamente correlacionada com os parâmetros de cinética e
395 viabilidade espermática [29]. As EROs também podem alterar as funções mitocondriais,
396 tais como, síntese de ATP, homeostase do cálcio e transporte de metabólitos [16]. De
397 acordo com os resultados, os garanhões RC foram capazes de manter sua atividade
398 mitocondrial independente da presença da CoQ10, assim como os animais SC
399 imediatamente após a descongelação (T0). Porém, quando os espermatozoides dos
400 animais SC foram submetidos ao estresse metabólico (T30), em que há uma alta produção
401 de EROs e, conseqüentemente, estresse oxidativo, apenas as células espermáticas tratadas
402 com a CoQ10 no diluente de centrifugação, especialmente nas concentrações de 75 e 100
403 $\mu\text{mol/L}$, foram capazes de manter sua atividade metabólica. Este resultado difere do
404 encontrado por Baumber et al. [30] e Franco et al. [31], em que a adição de antioxidantes
405 não enzimáticos ao sêmen equino não mantiveram a atividade mitocondrial das células
406 espermáticas. Possivelmente esta diferença ocorreu devido a metodologia utilizada, uma
407 vez que, os animais não foram classificados em sensíveis ou resistentes a criopreservação.

408 A presença das EROs, em concentrações moderadas, é imprescindível para a
409 desestabilização da membrana e capacitação da célula espermática. Porém, elevadas
410 concentrações destes elementos podem ocasionar sérios danos aos espermatozoides [32].
411 De acordo com os resultados, a adição da CoQ10 conferiu uma estabilidade da membrana
412 plasmática maior às células espermáticas dos animais SC, quando comparado ao grupo
413 controle, demonstrando o potencial inibitório da coenzima a capacitação precoce. Estes
414 achados se assemelham aos encontrados por O'Flaherty et al. [33], os quais evidenciaram
415 a inibição da capacitação após a adição de superóxido dismutase (SOD) ao sêmen, o que
416 não ocorre após a adição do ânion superóxido.

417 Os resultados deste estudo demonstraram que há uma maior eficácia da ação da
418 CoQ10 quando adicionada ao diluente de centrifugação em detrimento ao diluente de
419 congelamento para o sêmen equino. Embora a centrifugação realizada no processo de
420 congelamento possa ser nociva e resultar em lesões mecânicas na membrana plasmática [34],
421 a adição da CoQ10 no momento pré-centrifugação provavelmente supriu uma deficiência
422 de estoque de antioxidante nas células espermáticas dos animais SC. É nesse momento
423 também que o espermatozoide encontra-se no auge do seu metabolismo energético,
424 facilitando assim a absorção de substâncias e trocas iônicas [35]. A suplementação de

425 antioxidantes associada a extração do plasma seminal, e conseqüentemente os
426 subprodutos do metabolismo espermático como as EROs, aumenta a viabilidade
427 espermática durante o processo de criopreservação [34].

428 Outro fator está associado ao caráter lipossolúvel da coenzima, com ação direta
429 nas cadeias lipídicas polinsaturadas. Possivelmente, a composição lipídica presente na
430 gema de ovo, componente essencial do diluente de congelação, compete com as células
431 espermáticas na utilização da CoQ10, fazendo com que o aproveitamento pelo
432 espermatozoide seja minimizado. Esta hipótese é embasada em estudos que, ao
433 criopreservar sêmen de caprinos, Khalifa et al. [36] obtiveram os melhores resultados
434 utilizando 5,0mM de antioxidante não enzimático em diluente contendo gema de ovo e
435 0,3mM do mesmo antioxidante em diluente livre de gema de ovo. De acordo com os
436 autores, quando o diluente contém gema de ovo, é necessário aumentar a concentração
437 do antioxidante como forma de compensar as perdas pela interação entre o antioxidante
438 e as PUFAs presentes nos componentes lipídicos da gema.

439 Podemos concluir que a CoQ10 é capaz de conter os danos oxidativos provocados
440 pelas espécies reativas ao oxigênio produzidas durante o processo de congelação
441 espermática de garanhões SC, mesmo quando submetidos ao estresse térmico por 30
442 minutos a 37°C, porém desde que seja adicionado ao diluente de centrifugação na
443 concentração de 75 µmol/L.

444

445 REFERÊNCIAS

446

447 [1] Moore I, Squires EL, Graham, JK. Effect of seminal plasma on cryopreservation of equine
448 spermatozoa. *Theriogenology* 2005; 63: 2372-2381.

449

450 [2] Brito LFC. Evaluation of stallion sperm morphology. *Clin Tech Equine Pract* 2007; 6: 249-
451 264.

452

453 [3] Morillo-Rodríguez A, Macías-garcía B, Tapia JA, Ortega-Ferrusola C, Peña FJ.
454 Consequences of butylated hydroxytoluene in the freezing extender on post-thaw characteristics
455 of stallion spermatozoa in vitro. *Andrologia* 2012; 44: 688-695.

456

457 [4] Maxwell WMC, Watson PF. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim Reprod*
458 *Sci* 1996; 42: 55- 65.

459

- 460 [5] Aurich C, Seeber P, Müller-Schlösser F. Comparison of Different Extenders with Defined
461 Protein Composition for Storage of Stallion Spermatozoa at 5° C. *Reprod Domest Anim* 2007;
462 42: 445-448.
463
- 464 [6] Lewin A, Lavon H. The effect of coenzyme Q10 on sperm motility and function. *Mol Aspects*
465 *Med* 1997; 18: 213-219.
466
- 467 [7] Patel SR, Sigman M. Antioxidant therapy in male infertility. *Urol Clin North Am* 2008; 35:
468 319-330.
469
- 470 [8] Carocho M, Ferreira ICFR. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy:
471 Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives.
472 *Food Chem Toxic* 2013; 51: 15-25.
473
- 474 [9] Alleva R, Scararmucci A, Mantero F, Bompadre S, Leoni L, Littarru GP. The protective role
475 of ubiquinol-10 against formation of lipid hydroperoxides in human seminal fluid. *Mol Aspects*
476 *Med* 1997; 18 (Supplement): 221-228.
477
- 478 [10] Bentinger M, Brismar K, Dallner G. The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion*
479 2007; 7S: 41-50.
480
- 481 [11] Papa FO, Melo CM, Fioratti EG, Dell'aqua Jr JA, Zahn FS, Alvarenga MA. Freezing of
482 stallion epididymal sperm. *Anim Reprod Sci* 2008; 107: 293–301.
483
- 484 [12] Dell'Aqua Jr JA, Papa FO, Alvarenga MA, Zahn FS. Effect of packing systems and thawing
485 temperature on spermatic parameters and fertility rate of frozen equine semen. *Rev Bras Reprod*
486 *Anim* 2001; 25: 458-460.
487
- 488 [13] Hartwig FP, Lisboa FP, Hartwig FP, Monteiro GA, Maziero RR, Freitas-Dell'aqua
489 CP, Alvarenga MA, Papa FO, Dell'aqua Jr, JA. Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: an
490 alternative for bad cooler stallions. *Theriogenology* 2014; 81: 340-346.
491
- 492 [14] Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin.
493 *Biol Reprod* 1988; 38: 1171-1180.
494
495

- 496 [15] Guasti PN, Freitas-Dell'aqua CP, Maziero RRD, Monteiro GA, Hartwig FP, Lisboa FP, Papa
497 PM, Papa FO. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide from subfertile stallion
498 spermatozoa during storage at refrigeration temperature. In: 39th Annual Conference of the IETS,
499 2012, Hannover. *Reprod Fertil Dev* 2012; 25: 20-20.
500
- 501 [16] Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies-Morel MCG. The effect of reactive
502 oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane
503 potential, and membrane lipid peroxidation. *J Androl* 2000; 21; 6: 895-902.
504
- 505 [17] Talevi R, Barbato V, Fiorentino I, Braun S, Longobardi S, Gualtieri R. Protective effects of
506 in vitro treatment with zinc, d-aspartate and coenzyme Q10 on human sperm motility, lipid
507 peroxidation and DNA fragmentation. *Reprod Biol Endoc* 2013; 11: 1-10.
508
- 509 [18] Gualtieri R, Barbato V, Fiorentino I, Braun S, Rizos D, Longobardi S, Talevi R. Treatment
510 with zinc, d-aspartate, and coenzyme Q10 protects bull sperm against damage and improves their
511 ability to support embryo development. *Theriogenology* 2014; 82: 592-598.
512
- 513 [19] Yousefian I, Zare-Shahneh A, Mahdi Zhandi M. The effect of Coenzyme Q10 and α -
514 Tocopherol in skim milk-based extender for preservation of Caspian stallion. *J Equine Vet Sci*
515 2014; 34: 949-954.
516
- 517 [20] Aurich C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion
518 spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2005; 89: 65-75.
519
- 520 [21] Macías GB, González FL, Ortega FC, Salazar-Sandoval C, Morillo RA, Rodríguez MH,
521 Tapia JA, Morcuende D, Peña FJ. Membrane lipids of the stallion spermatozoon in relation to
522 sperm quality and susceptibility to lipid peroxidation. *Reprod Domest Anim* 2011; 46:141-148.
523
- 524 [22] Kothari S, Thompson A, Agarwal A, Plesses SS. Free radicals: Their beneficial and
525 detrimental effects on sperm functions. *Indian J Exp Biol* 2010; 48: 425-435.
526
- 527 [23] Nogueira BG, Zúccari CESN. Coenzima Q10 e α -Tocoferol previnem a Lipoperoxidação do
528 sêmen equino refrigerado. 2015. 54p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina
529 Veterinária e Zootecnia da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso
530 do Sul.
531

- 532 [24] Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration. Where are we now? Journal of
533 Neurochemistry. 2006;97:1634-1658.
534
- 535 [25] Ognjanović BI, Marković SD, Đorđević NZ, Trbojević IS, Štajn AŠ, Saičić ZS. Cadmium-
536 induced lipid peroxidation and changes in antioxidant defense system in the rat testes: Protective
537 role of coenzyme Q10 and Vitamin E. *Reprod Toxicol* 2010;29(2):191-197.
538
- 539 [26] Turunen M, Olsson J, Dallner G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim Biophys*
540 *Acta* 2004; 1660: 171-199.
541
- 542 [27] Gibb Z, Lambourne SR, Aitken RJ. The paradoxical relationship between stallion fertility
543 and oxidative stress. *Biol Reprod* 2014; 91: 1-10.
544
- 545 [28] Johannisson A, Lundgren A, Humblot P, Morrell JM. Naturally and stimulated levels of
546 reactive oxygen species in cooled stallion semen destined for artificial insemination. *Animal*
547 2014; 10: 1-9.
548
- 549 [29] Garner DL, Thomas CA, Joerg HW, Dejanertte JM, Marshall CE. Fluorometric assessments
550 of mitochondrial function and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biol Reprod*
551 1997; 57: 1401-1406.
552
- 553 [30] Baumber J, Ball BA, Linfor JJ. Assessment of cryopreservation of equine spermatozoa in
554 the presence of enzyme scavengers and antioxidants. *Am J Vet Res* 2005; 57: 772-779.
555
- 556 [31] Franco JSV, Chaveiro A, Gois A, Silva FM. Effects of α -tocopherol and ascorbic acid on
557 equine semen quality after cryopreservation. *J Equine Vet Sci* 2013; 33: 787-793.
558
- 559 [32] Valença RMB, Guerra MMP. Espécies reativas ao oxigênio (ROS) e a utilização de
560 antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. *Rev Bra Reprod Anim* 2007; 31:47-53.
561
- 562 [33] O'flaherty CM, Beorlegui NB, Beconi MT. Reactive oxygen species requirements for bovine
563 sperm capacitation and acrosome reaction. *Theriogenology* 1999;52:289-301.
564
- 565 [34] Barrier-Battut I, Bonnet C, Giraud A, Dubois, C, Caillaud M, Vidament M. Removal of
566 seminal plasma enhances membrane stability on fresh and cooled stallion spermatozoa. *Reprod*
567 *Domest Anim* 2013; 48: 64-71.
568

- 569 [35] Squires EL, Pickett BW, Graham JK, Vanderwall DK, Mccue PM, Bruemmer JE. Cooled
570 and frozen stallion semen. *Anim Reprod Biotec Lab* 1999;9:01-38.
571
- 572 [36] Khalifa TA, Lymberopoulos AG, El-Saidy BE. Testing usability of butylated hydroxytoluene
573 in conservation of goat semen. *Reprod Domest Anim* 2008; 43: 525–30.