

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

EFEITO DA ADIÇÃO DE BUTIL-HIDROXITOLUENO NOS MEIOS
DE REFRIGERAÇÃO E CONGELAÇÃO SOBRE A VIABILIDADE
ESPERMÁTICA DE EQUINOS

ENDRIGO ADONIS BRAGA DE ARAUJO

Botucatu – SP
Fevereiro/2016

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

EFEITO DA ADIÇÃO DE BUTIL-HIDROXITOLUENO NOS MEIOS
DE REFRIGERAÇÃO E CONGELAÇÃO SOBRE A VIABILIDADE
ESPERMÁTICA DE EQUINOS

ENDRIGO ADONIS BRAGA DE ARAUJO

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia
Animal, Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho” – UNESP, Campus de Botucatu,
para obtenção de título de Mestre

Orientador: Prof. Dr. Frederico Ozanam
Papa

Botucatu – SP
Fevereiro/2016

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

Araujo, Endrigo Adonis Braga de.

Efeito da adição de Butil-hidroxitolueno aos meios de refrigeração e congelação sobre a viabilidade espermática de equinos / Endrigo Adonis Braga de Araujo. - Botucatu, 2016

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

Orientador: Frederico Ozanam Papa

Capes: 50504002

1. Equino. 2. Criopreservação. 3. Preservação do sêmen. 4. Hidroxitolueno butilado. 5. Antioxidantes.

Palavras-chave: Antioxidante; BHT; Criopreservação de sêmen; Garanhão.

Nome do autor: Endrigo Adonis Braga de Araujo

Título: EFEITO DA ADIÇÃO DE BUTIL-HIDROXITOLUENO NOS MEIOS DE REFRIGERAÇÃO E CONGELAÇÃO SOBRE A VIABILIDADE ESPERMÁTICA DE EQUINOS

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

Presidente e orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ – UNESP
– Botucatu /SP

Prof.^a Dr.^a Fabíola Soares Zahn

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ – UNESP
– Botucatu /SP

Prof. Dr. André Maciel Crespilho

Membro

Departamento de Reprodução Animal – UNISA – Santo Amaro/SP

Data da defesa: 26 de fevereiro de 2016.

DEDICO

À minha mãe Sueli e meu “Paidrasto”
Jorge por me incentivarem e estarem
comigo em todos os momentos,
acreditando em meus sonhos.

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus por abençoar minha vida e me ajudar a chegar até aqui.

A minha mãe e “paidrasto” por me mostrar que a vida é cheia de obstáculos a serem vencidos, mas que cabe a nós enfrentá-los e alcançar a vitória.

A meu pai Nivaldo que mesmo distante sempre apostou em mim e me incentivou a trilhar meu caminho em busca da realização dos sonhos.

A minha noiva Kerlianny pela paciência e apoio em todos os momentos.

Aos componentes da “Casa Bahia”, Sidnei Nunes de Oliveira, Luis Fernando Mercês Chaves Silva e Bertiny Moreira Pinto, por fazerem parte da minha vida e contribuírem efetivamente para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa pela amizade e pela confiança na realização deste trabalho.

Aos professores e servidores do departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária pelo acolhimento e todo ensinamento.

Aos amigos que conquistei nessa trajetória, que foram de suma importância para realização deste trabalho e para a minha permanência nessa cidade.

A FAPESP pela concessão da bolsa.

LISTA DE ABREVIATÖES

ERO – espécies reativas de oxigênio
DNA – ácido desoxirribonucleico
BHT – butil-hidroxitolueno
ATP – trifosfato de adenosina
NAD⁺ - nicotinamida adenina dinucleotídeo
FAD – flavina-adenina dinucleotídeo
ADP – difosfato de adenosina
O₂ - oxigênio
H₂O - água
NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
H⁺ - próton
QH₂ – ubiquinona reduzida
O₂⁻ - ânion superóxido
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
OH⁻ - radical hidroxila
NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NOX5 – NADPH oxidase 5
RNAm – ácido ribonucleico mensageiro
ZP3 – glicoproteína 3 da zona pelúcida
AC – adenilato-ciclase
AMPc – 3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico
PKA – proteína cinase A2
pH – potencial hidrogeniônico
LOOH – hidroperóxido lipídico
4HNE – 4-hidroxinonenal
DAG – 1,2-diacil glicerol
SOD – superóxido dismutase
CAT - catalase
GPx – glutational peroxidase
DMSO – dimetilsulfóxido

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1.....	1
1. Introdução.....	2
2. Revisão de literatura	3
2.1. Espermatozoide.....	3
2.2. Metabolismo energético.....	4
2.2.1. Cadeia transportadora de elétrons e fosforilação oxidativa.....	5
2.3. Espécies reativas de oxigênio.....	6
2.3.1. Ânion Superóxido.....	6
2.3.2. Peróxido de hidrogênio.....	7
2.3.3. Radical hidroxila.....	7
2.4. Origem das espécies reativas de oxigênio no espermatozoide.....	7
2.5. Papel desempenhado pelas espécies reativas de oxigênio nos mecanismos fisiológicos e patológicos.....	8
2.6. Crioinjúria	11
2.7. Antioxidantes.....	12
2.7.1. Butil-hidroxitolueno (BHT).....	13
Referências	15
Hipótese.....	24
Objetivos gerais	24
Objetivos parciais	24
CAPÍTULO 2: ARTIGO – BUTIL-HIDROXITOLUENO REDUZ PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO APÓS ESTRESSE EM SÊMEN CRIOPRESERVADO DE EQUINOS.....	26
1. Introdução.....	28
2. Material e métodos.....	29
2.1. Aspectos éticos.....	29
2.2. Preparação da solução de BHT.....	29
2.3. Animais	29
2.4. Processamento do sêmen.....	30
2.5. Refrigeração do sêmen.....	30
2.6. Congelação do sêmen.....	30
2.7. Análises espermáticas.....	31
2.7.1. Cinética espermática.....	31
2.7.2. Avaliação por citometria de fluxo.....	31
2.8. Experimento 1: avaliação de diferentes concentrações de BHT.....	33
2.9. Experimento 2: efeito da adição de BHT em meio de refrigeração de sêmen equino.....	33

2.9.1. Influência da adição de BHT sobre a qualidade do sêmen refrigerado de garanhões classificados como Good Coolers (GC) e Bad Coolers (BC).....	34
2.10. Experimento 3: efeito da adição de BHT em meio de congelação de sêmen equino.....	34
2.10.1. Influência da adição de BHT sobre a qualidade do sêmen congelado de garanhões classificados como Good Freezers (GF) e Bad Freezers (BF).....	34
2.11. Experimento 4: Efeito do BHT sobre a peroxidação lipídica e produção de ERO após teste de indução da geração de ERO.....	35
2.12. Análises estatísticas.....	35
3. Resultados.....	36
3.1. Experimento 1.....	36
3.2. Experimento 2.....	36
3.2.1. Influência da adição de BHT sobre a qualidade do sêmen refrigerado de garanhões classificados como Good Coolers (GC) e Bad Coolers (BC).....	37
3.3. Experimento 3.....	38
3.3.1. Influência da adição de BHT sobre a qualidade do sêmen congelado de garanhões classificados como Good Freezers (GF) e Bad Freezers (BF).....	39
3.4. Experimento 4.....	40
4. Discussão.....	41
Referências.....	45

RESUMO

ARAÚJO, E.A.B. EFEITO DA ADIÇÃO DE BUTIL-HIDROXITOLUENO NOS MEIOS DE REFRIGERAÇÃO E CONGELAÇÃO SOBRE A VIABILIDADE ESPERMÁTICA DE EQUINOS. Botucatu – SP. 2016, p. 49. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

O processo de criopreservação acarreta estresse oxidativo à célula espermática e a adição de antioxidantes aos meios de refrigeração e congelamento de sêmen pode auxiliar na proteção dos espermatozoides contra o dano induzido pelas espécies reativas de oxigênio (ERO), incluindo perda da motilidade de forma irreversível, peroxidação lipídica e fragmentação do DNA, interferindo na capacidade de fertilização do espermatozoide. Dentre os diferentes antioxidantes, o Butil-hidroxitolueno (BHT) é um análogo sintético da vitamina E, cujo efeito protetor é atribuído a dois mecanismos: o aumento da fluidez da membrana plasmática após a incorporação do antioxidante, e o segundo por conter a cascata de peroxidação lipídica pela conversão de peroxil em hidroperóxido lipídico. O BHT foi testado em diversas espécies demonstrando melhora na motilidade, integridade de membrana plasmática e viabilidade espermática; porém, na espécie equina, a inclusão de BHT em diluentes para criopreservação de sêmen necessita ser melhor avaliada. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do BHT nas células espermáticas de equinos submetidas à criopreservação e sua capacidade de conter a peroxidação lipídica e produção de espécies reativas de oxigênio quando os espermatozoides foram submetidos a estresse.

Palavras-chave: antioxidante; BHT, criopreservação de sêmen; garanhão.

ABSTRACT

ARAUJO, E.A.B. EFFECT OF THE ADDITION OF BUTYLATED HYDROXYTOLUENE INTO COOLING AND FREEZING EXTENDERS ON THE VIABILITY OF EQUINE SPERM. Botucatu – SP. 2016 p. 49. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

The process of cryopreservation brings out oxidative stress to spermatogenic cell and the addition of antioxidant into cooling and freezing semen extenders could assist in protection of spermatozoa against the damage induced by reactive oxygen species (ROS), including irreversible loss in motility, lipid peroxidation and DNA fragmentation, interfering with the fertilizing capacity of sperm. Among different antioxidants, the butylated hydroxytoluene (BHT) is a synthetic analogue of vitamin E, whose protective effect is attributed to two mechanisms: the increase in sperm membrane fluidity after the addition of antioxidant, and the lipid peroxidation cascade for converting peroxy radicals into lipid hydroperoxides. BHT was tested in different species and the results include improvement in motility, spermatogenic membrane integrity and sperm viability. However, the addition of BHT in horse semen extenders for cryopreservation purposes demands further research. Thereby, the aims of this study were (1) to evaluate the influence of BHT on equine spermatogenic cells submitted to cryopreservation and (2) the capacity of BHT to contain the lipid peroxidation and the production of reactive species of oxygen when sperm cells were submitted to stress.

Keywords: antioxidants, BHT, semen cryopreservation, stallion.

Capítulo 1

1. INTRODUÇÃO

A criopreservação do sêmen criou uma nova dimensão para a indústria do cavalo, tornando possível a preservação de material biológico por maior tempo ou por período ilimitado, otimizando o uso de garanhões com genética superior e reduzindo os custos com transporte. Além disso, barreiras geográficas são abolidas e pode-se utilizar o sêmen de garanhões que se encontram em recuperação de enfermidades que os impeçam de acasalar e até mesmo de garanhões mortos (MILLER, 2008).

O sêmen equino quando submetido à criopreservação tem sua viabilidade e fertilidade reduzida devido ao estresse oxidativo, resultado de um desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (ERO) e antioxidantes (WATSON, 2000; ANDRADE et al., 2010).

As ERO, a depender de sua concentração, desencadeiam processos fisiológicos ou patológicos aos espermatozoides. Em baixas concentrações, desencadeiam eventos de sinalização celular e de regulação da maturação, capacitação, hiperativação espermática, reação acrossomal e da união entre espermatozoide e oócito. Por outro lado, em altas concentrações, são prejudiciais pois induzem peroxidação lipídica, fragmentação do ácido desoxirribonucleico (DNA) e apoptose (LAMIRANDE et al., 1997; BAUMBER et al., 2000; KOTHARI et al., 2010). A adição de antioxidantes aos diluentes visa balancear a concentração de ERO para diminuir os danos nos espermatozoides.

Dentre os diversos antioxidantes existentes, o butil-hidroxitolueno (BHT), análogo sintético da vitamina E, foi testado em adição aos diluentes de congelamento em diversas espécies, bubalina (IJAZ et al., 2009), bovina (SHOAE; ZAMIRI, 2008; ANSARI et al., 2011), caprina (MEMON et al., 2011; NAIJIAN et al., 2013), canina (NEAGU et al., 2010) e suína (ROCA et al., 2004; TRZCINSKA et al., 2015) demonstrando aumento da motilidade, integridade de membrana plasmática e viabilidade espermática. Porém, em equinos, as avaliações são insuficientes, abrindo a possibilidade de estudos quanto ao seu efeito nos meios de refrigeração e congelamento do sêmen, principalmente quando testados em garanhões com baixa qualidade seminal e baixa resistência a criopreservação. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do BHT nas células espermáticas de equinos submetidas à criopreservação e sua capacidade de

conter a peroxidação lipídica e produção de espécies reativas de oxigênio quando os espermatozoides foram submetidos a estresse.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. ESPERMATOZOIDE

O espermatozoide é dividido morfológicamente em cabeça e cauda (flagelo). A cabeça contém o núcleo, acrossoma e um conjunto reduzido de elementos citosólicos, e é dividida em região acrossomal, segmento equatorial e região pós-acrossomal. A cauda pode ser subdividida em peça intermediária, principal e final (VARNER et al., 2015).

A maioria das organelas e citoplasma são removidos durante a espermiogênese e trânsito no epidídimo, modificando o espermatozoide a partir de uma célula esférica convencional em uma das células mais especializadas do organismo. Nessa transformação, além da remoção ou modificação de organelas (retículo endoplasmático, ribossomos e aparelho de Golgi), ocorre a compactação do DNA e a célula torna-se capaz de se mover (TOSHIMORI; ITO, 2003; MILLER et al., 2010).

A remoção do citoplasma e de várias organelas deve ser ressaltada por ser um dos fatores responsáveis pela vulnerabilidade dos espermatozoides ao estresse oxidativo, uma vez que as enzimas antioxidantes ficam armazenadas no citoplasma celular (AITKEN et al., 2014).

A cromatina no interior do núcleo do espermatozoide é altamente condensada, com volume cerca de 10% ou menor do que o de uma célula somática. Para adquirir esse nível de compactação, as histonas são substituídas por protaminas e o complexo DNA-protamina é enrolado numa forma helicoidal. Esse modelo fornece proteção adicional contra os efeitos de fatores genotóxicos e confere conformação ideal à célula para executar sua função, facilitando a mobilidade e penetração na zona pelúcida (BRAUN, 2001; MILLER et al., 2010).

Recobrando dois terços do núcleo em sua porção apical, localiza-se o acrossoma, estrutura vesicular derivada do complexo de Golgi, rica em enzimas hidrolíticas, proteases e receptores para executar a interação com o oócito, e possibilitar a fertilização (HERMO et al., 2010).

Em relação aos constituintes das membranas celulares, os espermatozoides equinos contêm em média 14% de lipídios, sendo 59,0% de fosfolipídios, 13% de colesterol, 9,0% de diglicerídeos, 8,0% de triglicerídeos e 11,0% de ésteres. Dentre os lipídios neutros, o colesterol é o que apresenta o teor mais variável entre espécies e entre ejaculados de um mesmo indivíduo, variando de 13 a 37% do total de lipídeos. A função do colesterol é estabilizar os fosfolipídios, mantendo a membrana em um estado de fluidez compatível com a sobrevivência da célula e execução de sua tarefa (KOMAREK et al., 1965; GADELA et al., 2001). Os ácidos graxos insaturados em concentração mais elevada são: ácido araquidônico (18%), ácido docosapentanóico (17%), ácido oleico (5%) e ácido docosahexanóico (8%). A proporção de ácidos graxos insaturados para ácidos graxos saturados nos fosfolipídios dos espermatozoides de garanhão é de 0,90 (CHOW et al., 1986). Essa alta proporção de ácidos graxos insaturados é outro ponto de vulnerabilidade dos espermatozoides aos efeitos de ERO.

Os elementos estruturais principais do flagelo incluem o axonema, as fibras densas exteriores, a bainha fibrosa e as mitocôndrias (dispostas de modo helicoidal). O axonema é uma estrutura formada por α e β -tubulina dispostas num par de microtúbulos centrais, rodeado por outros nove pares periféricos e equidistantes entre si, ligados por braços de dineína (VARNER; JOHNSON 2007).

2.2. METABOLISMO ENERGÉTICO

Para cumprir sua função de transportar o material genético para dar origem a um novo ser, o espermatozoide passa por diversos processos (mobilidade, capacitação, reação acrossomal, singamia) que necessitam de trifosfato de adenosina (ATP). Para isso, as células espermáticas utilizam diversas vias metabólicas para sobreviver sob diferentes fontes de energia, sendo a fosforilação oxidativa a mais proeminente. Esta versatilidade é fundamental para garantir o sucesso da fertilização (RUIZ-PESINI et al., 2007).

A glicose é o principal açúcar utilizado pelos espermatozoides equinos, devido a capacidade muito limitada de metabolizar a frutose. A metabolização

pode ser realizada pela via anaeróbia, degradando-a em ácido láctico (glicólise), ou em aerobiose (VARNER; JOHNSON, 2007).

A produção de ATP inicia-se com a glicólise e quase toda a energia disponível pelo consumo de carboidratos é conservada na forma de elétrons de alta energia, removidos dos substratos pela nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) e pela flavina-adenina dinucleotídeo (FAD). A etapa seguinte consiste na oxidação dessas coenzimas reduzidas pela cadeia de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa e captação da energia para produzir ATP (ALBERTS et al., 2010)

2.2.1. CADEIA TRANSPORTADORA DE ELÉTRONS E FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA

A compreensão do transporte de elétrons e da fosforilação oxidativa é de fundamental importância para entender o metabolismo celular e a maneira pela qual ocorre a geração de radicais livres, visto que todos os passos oxidativos na degradação de moléculas ricas em energia convergem para esse estágio final da respiração celular, no qual a energia da oxidação governa a síntese de ATP a partir de difosfato de adenosina (ADP) e fosfato inorgânico. Diversas etapas deste processo de redução de oxigênio nas mitocôndrias podem gerar radicais livres altamente reativos, que podem danificar as células (NELSON; COX, 2014).

Os componentes da cadeia transportadora de elétrons estão localizados na membrana interna das mitocôndrias. Essa é a via comum pela qual os elétrons de diferentes combustíveis do organismo fluem para o oxigênio (CHAMPE et al., 2006). A cadeia respiratória é organizada em cinco complexos supramoleculares, sendo que, ao final, o oxigênio (O_2) é reduzido gerando água (H_2O). Os complexos I e II catalisam a transferência de elétrons para a ubiquinona a partir de dois doadores de elétrons diferentes: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH, complexo I) e succinato (complexo II). O complexo III carrega elétrons da ubiquinona reduzida para o citocromo c, e o complexo IV transfere elétrons do citocromo c para o O_2 . Neste processo, prótons (H^+) bombeados para o espaço intermembranar geram um gradiente químico e elétrico que possibilita o fluxo inverso dos prótons pela ATP sintetase (complexo V), com a resultante formação de ATP (NELSON; COX, 2014).

A produção mitocondrial de radicais superóxido ocorre principalmente em dois pontos da cadeia transportadora de elétrons, no complexo I (NADH: coenzima Q redutase) e no complexo III (ubiquinol: citocromo c redutase). No entanto, dentre os dois pontos, o complexo III é o principal local de produção de ERO. Elétrons dos complexos desidrogenases I ou II são transferidos à coenzima Q (ubiquinona). A forma reduzida resultante (QH₂), em seguida, sofre duas reduções sequenciais de um elétron (o ciclo Q) usando formas de citocromo b oxidada e reduzida e citocromo c. O intermediário instável no ciclo Q pode conduzir à formação de superóxido por transferência direta de elétrons para o oxigênio molecular. A geração de superóxido é não enzimática e, portanto, quanto maior a taxa de metabolismo, maior será a produção de ERO (FINKEL; HOLBROOK, 2000).

2.3. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

As ERO ou radicais livres de oxigênio são quaisquer compostos que contenham um ou mais elétrons não emparelhados. São instáveis e altamente reativos, tendo a capacidade de reagir com um grande número de compostos que estejam próximos, causando uma cascata de reações. Eles podem exercer a função de agentes oxidantes, atuando como receptores de elétrons, ou de agentes redutores, atuando como doadores de elétrons, sendo os três principais tipos de ERO: superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e hidroxila (OH⁻) (SIKKA, 2001; AGARWAL et al., 2005).

2.3.1. ÂNION SUPERÓXIDO (O₂⁻)

Gerado pela adição de um elétron principalmente na membrana mitocondrial, pela cadeia respiratória, após a primeira redução do oxigênio molecular. O ânion superóxido é pouco reativo e não possui a capacidade de penetração através da membrana lipídica, agindo somente no compartimento onde é produzido. É o produto primário do sistema de formação de ERO, participando da formação do peróxido de hidrogênio pela ação da enzima superóxido dismutase (NOGUEIRA et al., 2013; SIKKA, 2001).

2.3.2. PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Metabólito do oxigênio, possui características importantes, mesmo não sendo considerado um radical livre por não apresentar elétron desemparelhado na última camada. O peróxido de hidrogênio possui vida longa e elevada propriedade de difusão biológica, sendo altamente tóxico para as células (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). 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).

2.3.3. RADICAL HIDROXILA ($\text{OH}^\cdot$)

Considerada a espécie de oxigênio mais reativa em sistemas biológicos, o radical hidroxila é muito enérgico e de curta duração (SIKKA, 2001). A sua combinação extremamente rápida com metais ou outros radicais no sítio onde foi produzido promove danos ao DNA, inativação proteica e oxidação de ácidos graxos das membranas celulares (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

2.4. ORIGEM DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NO ESPERMATOZOIDE

A principal fonte de ERO em espermatozoides é, provavelmente, a mitocôndria. Diversas etapas podem gerar o radical livre superóxido, pela passagem de elétrons de QH_2 ao complexo III e da passagem de elétrons dos complexos I e II ao QH_2 envolvendo o radical $\text{Q}^\cdot$ como intermediário. O $\text{Q}^\cdot$ pode deixar vaziar elétron ao O_2 , gerando o radical superóxido. (NELSON; COX, 2014).

A atividade mitocondrial na geração de ERO foi comprovada por meio da utilização de Antimicina A e Myxothiazol, que atuam no complexo III da cadeia transportadora de elétrons, resultando em aumento significativo da atividade redox em espermatozoides humanos (KOPPERS et al., 2008).

Além das fontes mitocondriais, vários estudos levantaram a hipótese de que um sistema enzimático localizado na membrana plasmática do espermatozoide, que utiliza nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) como

substrato da via oxidase dependente, é uma importante fonte de ERO (ARMSTRONG et al., 2002; BAKER et al., 2003; FORD, 2004; MUSSET, 2012).

Os estudos de Sabeur e Ball (2007) fornecem evidências de que NADPH oxidase 5 (NOX5) está presente no testículo e espermatozoides equinos com base na expressão do ácido ribonucleico mensageiro (RNAm), assim como em sua imunolocalização.

Os resultados de Aitken et al. (1997), também demonstraram a participação do NADPH na produção de ERO em espermatozoides humanos ao inibir a cadeia transportadora de elétrons. A adição de NADPH em populações de espermatozoides móveis induziu um aumento repentino na taxa de geração de superóxido mesmo inibindo a cadeia de transporte de elétrons por meio de diversos compostos.

2.5. PAPEL DESEMPENHADO PELAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NOS MECANISMOS FISIOLÓGICOS E NO DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS PATOLÓGICOS

Os espermatozoides são células produzidas pelos testículos, porém só adquirem competência funcional após passar por processo de maturação pós-testicular, durante o trânsito no epidídimo. Após a ejaculação, no trajeto pelo trato reprodutivo feminino até o sítio de fertilização, o espermatozoide sofre capacitação, ganhando habilidade de movimento hiperativado e respondendo a sinais que iniciam a sequência de interação celular que culmina na fertilização. Neste percurso, os espermatozoides passam por uma série complexa de transformações que envolvem alterações metabólicas, iônicas e da membrana e que são chamadas coletivamente de capacitação (JONGE, 2005).

Para o espermatozoide penetrar na zona pelúcida do oócito, é necessário a hiperativação do movimento, que ocorre no local da fertilização; esse é um processo fundamental compreendido na capacitação espermática (HO; SUAREZ, 2001). Já a reação acrossômica é um evento de exocitose, iniciado após a ligação de uma célula espermática à glicoproteína 3 da zona pelúcida (ZP3) do oócito, no qual enzimas hidrolíticas e proteolíticas (principalmente acrosina e hialuronidase) são liberadas para poder penetrar a zona pelúcida e fundir-se ao oócito. A fusão entre a membrana acrossomal externa e a

membrana plasmática na cabeça do espermatozoide ocorre de forma a liberar o conteúdo acrossômico (FLORMAN et al., 2008).

O primeiro evento na capacitação é o efluxo de colesterol, que está associado com a ativação das vias de transdução de sinais. A membrana plasmática da cabeça do espermatozoide tem quantidades elevadas de colesterol, que regulam a fluidez da membrana (FLESCH; GADELLA, 2000). O efluxo é promovido mediante carreadores de esterol, como albumina e lipoproteínas de alta densidade presentes no fluido uterino e fluido folicular.

Esse aumento na fluidez da membrana pode incrementar a permeabilidade da membrana para vários íons, tais como cálcio e bicarbonato, que afetam as moléculas de sinalização (NAZ; RAJESH, 2004).

O influxo de cálcio e bicarbonato ativam a adenilato-ciclase (AC) para produzir 3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico (AMPc), que ativa a proteína quinase A2 (PKA) para fosforilar, indiretamente, determinadas proteínas em resíduos de tirosina (FLESCH; GADELLA, 2000). O aumento do cálcio intracelular é um dos acontecimentos bioquímicos cruciais durante a capacitação e reação acrossomal (FLORMAN et al., 1992).

O mecanismo exato pelo qual o bicarbonato regula a capacitação não é claro, no entanto seu influxo tem sido associado a um aumento intracelular do potencial hidrogeniônico (pH), regulação dos níveis de AMPc e hiperpolarização da membrana plasmática (NISHIGAKI et al., 2014).

Fosforilação de proteínas, especialmente em resíduos de tirosina, é um dos acontecimentos mais importantes que ocorrem durante a capacitação. A fosforilação é uma modificação que funciona como um dos principais mecanismos de regulação da célula agindo sobre modulação iônica e regulação de receptores, sendo que a adição ou remoção de grupos fosfato pode induzir alterações conformacionais que resultam em ativação ou inativação (PAWSON, 2004).

Evidências de que ERO estão envolvidas na capacitação espermática e reação acrossomal são demonstradas em experimentos que evidenciaram a inibição da capacitação após a adição de superóxido dismutase (SOD) ao sêmen, o que não ocorre após a adição do ânion superóxido. Além disso, quando adicionado peróxido de hidrogênio ao sêmen, ocorreu reação acrossomal em bovinos (O'FLAHERTY et al., 1999).

Em relação ao desenvolvimento de processos patológicos, as ERO estão relacionadas a causas de infertilidade devido a dois processos principais: danos às membranas espermáticas e dano ao DNA. As membranas possuem grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados, tornando os espermatozoides susceptíveis aos efeitos das ERO quando ocorre estresse oxidativo, o que pode afetar a motilidade espermática e sua capacidade em fertilizar os oócitos. Por outro lado, a fragmentação do DNA pode prejudicar a contribuição paterna do material genético para o desenvolvimento do embrião (TREMELLEN, 2008).

Esse processo chamado de peroxidação lipídica pode ser definido como a deterioração oxidativa dos lipídios contendo qualquer número de ligações duplas carbono-carbono. Peróxidos lipídicos são instáveis e decompõem-se para formar uma série complexa de compostos (EL-BELTAGI; MOHAMED, 2013). Essa cascata de eventos bioquímicos resultantes da ação das ERO sobre os lipídios insaturados das membranas celulares gera principalmente radical alquila, alcoila e peroxila, levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e à morte celular (REPETTO et al., 2010)

Basicamente, a lipoperoxidação consiste na incorporação de oxigênio molecular a um ácido graxo poli-insaturado para produzir um hidroperóxido lipídico (LOOH) como produto primário inicial. Como resultado, a retirada de hidrogênio, evento que inicia a peroxidação lipídica, é promovida, desencadeando uma cascata que, em última análise, conduz à geração de aldeídos eletrofílicos tais como acroleína, 4-hidroxinonenal (4HNE), e de malondialdeído (AITKEN et al., 2014).

As proteínas e DNA também estão sujeitos a modificação oxidativa e perdas por aldeídos, tais como o 4HNE. As proteínas conduzidas por 4HNE incluem elementos da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, como ácido succínico desidrogenase. O resultado desse efeito eletrofílico é estimular a geração de ERO mitocondriais em um ciclo de geração de autoperpetuação que, em última análise, provoca a via apoptótica intrínseca, levando a uma rápida perda de motilidade e morte celular (GANDINI et al., 2000; AITKEN et al., 2014).

2.6. CRIOINJÚRIAS

A criopreservação espermática se difundiu em vista da possibilidade de armazenamento de sêmen por períodos longos (refrigeração) ou até mesmo indeterminados (congelamento) e por possuir diversas vantagens como a rápida difusão de material genético. Todavia, é um processo que impõe aos espermatozoides condições extremamente desfavoráveis à manutenção de sua viabilidade, principalmente devido ao estresse oxidativo e osmótico (BALL, 2008).

Dentre as mudanças observadas, ocorre uma reordenação de componentes lipídicos da membrana e perda de ácidos graxos poli-insaturados e colesterol, que culminam na fosforilação da tirosina. Este dano inicial promove o aumento da permeabilidade da membrana, influxo de cálcio, ativação da adenilato ciclase com o aumento da geração de AMPc e 1,2-diacylglicerol (DAG), que resulta na capacitação do espermatozoide pela fosforilação da tirosina. Além disso, a geração de choque térmico durante a criopreservação é associada com alta quantidade de ERO que também leva ao estresse oxidativo e fosforilação da tirosina (NARESH; ATREJA, 2015).

Os danos às mitocôndrias do espermatozoide criopreservado foram apontados como causa para a baixa fertilidade (BALL, 2008). O processo de congelamento e descongelamento interferem na mitocôndria prejudicando suas funções bioenergéticas que, por sua vez, prejudicam as funções fisiológicas desde a motilidade até a singamia. Além disso a disfunção mitocondrial pode levar à formação de ERO, o que resulta em capacitação prematura em espermatozoides criopreservados (REDDY et al., 2010).

Os efeitos do estresse oxidativo são particularmente importantes durante a criopreservação, pois a maior parte da capacidade antioxidante do sêmen está contida no plasma seminal, que é removido durante o processo de congelamento (BALL, 2008). O uso de aditivos, dentre eles os antioxidantes, pode reduzir a capacitação prematura nos espermatozoides.

2.7. ANTIOXIDANTES

Antioxidante pode ser definido como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas àquela do substrato oxidável, retarda ou previne significativamente a oxidação daquele substrato. Em condições normais, os antioxidantes convertem ERO em água protegendo as células e o organismo dos efeitos nocivos ocasionados pela superprodução. Eles podem ser classificados em substâncias ou moléculas enzimáticas e não enzimáticas (SIES, 2001).

Os antioxidantes enzimáticos compõem o primeiro sistema de defesa a agir no organismo, neutralizando o excesso de ERO e prevenindo danos à estrutura celular. Fazem parte deste grupo a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx) (NORDBERG; ARNÉR, 2001; ANDRADE et al., 2010).

A SOD é considerada uma metaloenzima; seu papel antioxidante é exercido quando catalisa a dismutação de duas moléculas de O_2^- em H_2O_2 e O_2 . A CAT é responsável por catalisar a dismutação de H_2O_2 , reduzindo a duas moléculas de H_2O e uma de O_2 . Sua ação antioxidante é de grande relevância, pois diminui o risco de formação do radical $OH^\cdot$. Já a GPx, além de atuar na redução do H_2O_2 em H_2O e O_2 , também atua na redução de outros peróxidos a álcool, como o lipoperóxido nas membranas celulares (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; NORDBERG; ARNÉR, 2001; BUSTAMANTE FILHO, 2006).

Nos últimos anos vários antioxidantes não enzimáticos foram testados em diluentes para criopreservação de espermatozoides equinos, como o α -tocoferol (ALMEIDA; BALL, 2005; FRANCO et al, 2013; YOUSEFIAN et al., 2014), o ácido ascórbico (FRANCO et al., 2013), o resveratrol (GIARETTA et al., 2014) e a quercetina (GIBB et al., 2013), apresentando diversas formas de ação e proteção às células.

A vitamina C é hidrossolúvel e considerada essencial. Em sistemas biológicos é encontrada sob a forma de ascorbato, que atua como antioxidante. Pode agir diretamente nas membranas celulares, impedindo o início da peroxidação lipídica, ou indiretamente pela regeneração do α -tocoferol, um antioxidante estrutural da membrana. Possui ação eficiente contra o ânion

superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxila e peroxila (BUSTAMANTE FILHO, 2006; ANDRADE et al., 2010).

A vitamina E é lipossolúvel e está presente em membranas biológicas. Dentre as suas variações, o α -tocoferol é o mais potente e, geralmente, a forma predominante. Este antioxidante atua interrompendo a reação em cadeia da peroxidação lipídica (NORDBERG; ARNÉR, 2001; ANDRADE et al., 2010).

2.7.1. BUTIL-HIDROXITOLUENO

Dentre os diferentes antioxidantes, o BHT é um análogo sintético 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 peroxil em hidroperóxido lipídico (AITKEN; CLARKSON, 1988).

O BHT foi testado em espermatozoides de búfalos (IJAZ et al., 2009), touros (SHOAE; ZAMIRI, 2008; ANSARI et al., 2011), bodes (MEMON et al., 2011; NAIJIAN et al., 2013), cães (NEAGU et al., 2010) e suínos (ROCA et al., 2004; TRZCINSKA et al., 2015), demonstrando aumento na motilidade, integridade de membrana plasmática e viabilidade espermática. Porém, há poucos estudos avaliando a influência do BHT sobre espermatozoides equinos e as avaliações, tanto em sêmen refrigerado quanto congelado, não demonstraram melhora na cinética e viabilidade espermática em relação ao grupo controle (BALL et al., 2001; MORILLO-RODRÍGUEZ et al., 2011).

O BHT é uma substância sólida branca e cristalina, com massa molar de 220,36g/mol, consistindo em 81,76% de carbono, 10,98% de hidrogênio e 7,26% de oxigênio ($C_{15}H_{24}O$) (BABICH, 1982).

Esta substância é obtida sinteticamente a partir de p-cresol e isobutileno; é insolúvel em água porém solúvel em solventes orgânicos como tolueno, metanol, etanol, isopropanol, etilmetilcetona, acetona, éter de petróleo, benzeno, Dimetilsulfóxido (DMSO) e na maioria dos outros solventes de hidrocarboneto. O BHT é um antioxidante fenólico sintético, utilizado na fabricação de diversas substâncias como aditivo alimentício, compondo formulações de produtos cosméticos, além de sua utilização para a produção de plásticos, óleos, lubrificantes, vitaminas e aromas (BABICH, 1982).

Visto que a viabilidade espermática e capacidade de fertilização são afetadas pelas ERO (BALL, 2008; NARESH; ATREJA, 2015), o BHT mostra-se uma opção promissora para reduzir os danos causados pelas ERO e promover maior longevidade aos espermatozoides; no entanto, novos estudos são necessários para avaliar seu efeito em espermatozoides de equinos durante o processo de criopreservação.

REFERÊNCIAS*

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.

AITKEN, R. J.; FISHER, H. M.; FULTON, N.; GOMEZ, E.; KNOX, W.; LEWIS, B.; IRVINE, S. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine. **Molecular Reproduction and Development**, v.47, p.468–482, 1997.

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.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1396 p.

ALMEIDA, J.; BALL, B. A. Effect of α -tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.87, p.321-337, 2005.

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

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

*De acordo com ABNT (Associação Nacional de Normas Técnicas) – NBR 6023, Agosto /2002.

ANSARI, M. S.; RAKHA, B. R.; AKHTER, S. Effect of Butylated Hydroxytoluene Supplementation in Extender on Motility, Plasmalemma and Viability of Sahiwal Bull Spermatozoa. **Pakistan Journal of Zoology**, v.43, n.2, p.311-314, 2011.

ARMSTRONG, J. S.; BIVALACQUA, T. J.; CHAMULITRAT, W.; SIKKA, S.; HELLSTROM, W. J. G. A comparison of the NADPH oxidase in human sperm and white blood cells. **International Journal of Andrology**, v.25, p.223–229, 2002.

BABICH, H. Butylated Hydroxytoluene (BHT): A Review. **Environmental Research**, v.29, p.1-29, 1982.

BAKER, M. A.; KRUTSKI KH, A.; AITKEN, R. J. Biochemical entities involved in reactive oxygen species generation by human spermatozoa. **Protoplasma**, v.221, p.145–151, 2003.

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

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

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

BRAUN, R.E. Packaging paternal chromosomes with protamine. **Nature Genetics**, v.28, p.10-12, 2001.

BUSTAMANTE-FILHO, I. C.; PEDERZOLLI, C. D.; SGARAVATTI, A. M.; MATTOS, R. C.; DUTRA-FILHO, C. S.; JOBIMA, M. I. M. Activity of glutathione peroxidase and catalase in stallion semen during cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v.94, p.70–73, 2006.

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

CHOW, P. Y. W.; WHITE, I. G.; PICKETT, B. W. Stallion sperm and seminal plasma phospholipids and glycerylphosphorylcholine. **Animal Reproduction Science**, v.11, p.207-213, 1986.

EL-BELTAGI, H. S.; MOHAMED, H. I. Reactive Oxygen Species, Lipid Peroxidation and Antioxidative Defense Mechanism. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v.41, n.1, p.44-57, 2013.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, p.61-68, 1997.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v.408, 2000.

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

FLORMAN, H. M.; CORRON, M.; KIM, T. D. H.; BABCOCK, D. Activation of Voltage-Dependent Calcium Channels of Mammalian Sperm Is Required for Zona Pellucida-Induced Acrosomal Exocytosis. **Developmental Biology**, v.152, p.304-314, 1992.

FLORMAN, H. M.; JUNGNICHEL, M. K.; SUTTON, K. A. Regulating the acrosome reaction. **The International Journal of Developmental Biology** v.52, p.503-510, 2008.

FORD, W. C. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. **Human Reproduction Update**, v.10, p.387-399, 2004.

FRANCO, J. S. V.; CHAVEIRO, A.; GÓIS, A.; SILVA, F. M. S. Effects of α -tocopherol and Ascorbic Acid on Equine Semen Quality after Cryopreservation. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.33, p.787-793, 2013.

GADELLA, B. M.; RATHI, R.; BROUWERS, J. F. H. M.; STOUT, T. A. E.; COLENBRANDER, B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.249-265, 2001.

GANDINI, L.; LOMBARDO, F.; PAOLI, D.; CAPONECCHIA, L.; FAMILIARI, G.; VERLENGIA, C.; DONDERO, F.; LENZI, A. Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. **Human Reproduction**, v.15, n.4, p.830-839, 2000.

GIARETTA, E.; BUCCI, D.; MARI, G.; GALEATI, G.; LOVE, C. C.; TAMANINI, C.; SPINACI, M. Is Resveratrol Effective in Protecting Stallion Cooled Semen? **Journal of Equine Veterinary Science**, v.34, p.1307-1312, 2014.

GIBB, Z.; BUTLER, T. J.; MORRIS, L. H. A.; MAXWELL, W. M. C.; GRUPEN, C. G. Quercetin improves the postthaw characteristics of cryopreserved sex-sorted and nonsorted stallion sperm. **Theriogenology**, v.79, p.1001-1009, 2013.

HERMO, L.; PELLETIER, R. M.; CYR, D. G.; SMITH, C. E. Surfing the Wave, Cycle, Life History, and Genes/Proteins Expressed by Testicular Germ Cells. Part 2: Changes in Spermatid Organelles Associated With Development of Spermatozoa. **Microscopy Research and Technique**, v.73, p.279-319, 2010.

HO, H. C.; SUAREZ, S. S. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. **Reproduction**, v.122, p.519-526, 2001.

IJAZ, A.; HUSSAIN, A.; ALEEM, M.; YOUSAF, M. S.; REHMAN, H. Butylated hydroxytoluene inclusion in semen extender improves the post-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v.71, p.1326-1329, 2009.

JONGE, C. D. Biological basis for human capacitation. **Human Reproduction Update**, v.11, n.3, p.205-214, 2005.

KOMAREK, R. J.; PICKETT, B. W.; GIBSON, E. W.; LANZ, R. N. Composition of lipids in stallion semen. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.10, p.337-342, 1965.

KOPPERS, A. J.; DE IULIIS, G. N.; FINNIE, J. M.; MCLAUGHLIN, E. A.; AITKEN, R. J. Significance of Mitochondrial Reactive Oxygen Species in the Generation of Oxidative Stress in Spermatozoa. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.93, n.8, p.3199-3207, 2008.

KOTHARI, S.; THOMPSON, A.; AGARWAL, A.; DU PLESSIS, S. S. free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.48, p.425-435, 2010.

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

MEMON, A. A.; WAHID, H.; ROSNINA, Y.; GOH, Y. M.; EBRAHIMI, M.; NADIA, F. M.; AUDREY, G. Effect of butylated hydroxytoluene on cryopreservation of Boer goat semen in Tris egg yolk extender. **Animal Reproduction Science**, v.129, p.44-49, 2011.

MILLER, C. D. Optimizing the use of frozen-thawed equine sêmen. **Theriogenology**, v.70, p.463–468, 2008.

MILLER D.; BRINKWORTH M.; ILES D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. **Reproduction**, v.139, n.2, p.287-301, 2010.

MORILLO-RODRÍGUEZ, A.; MACÍAS-GARCÍA, B.; TAPIA, J. A.; ORTEGA-FERRUSOLA, C.; PEÑA, F. J. Consequences of butylated hydroxytoluene in the freezing extender on post-thaw characteristics of stallion spermatozoa in vitro. **Andrologia**, v.44, p.688–695, 2012.

MUSSET, B.; CLARK, R. A.; DECOURSEY, T. E.; PETHEO, G. L.; GEISZT, M.; CHEN, Y.; CORNELL, J. E.; EDDY, C. A.; BRZYSKI, R. G.; EL JAMALI, Z. NOX5 in Human Spermatozoa: expression, function, and regulation. **The Journal of Biological Chemistry**, v.287, p.9376-9388, 2012.

NAIJIAN, H. R.; KOHRAM, H.; SHAHNEH, A. Z.; SHARAFI, M.; BUCAK, M. N. Effects of different concentrations of BHT on microscopic and oxidative parameters of Mahabadi goat semen following the freeze–thaw process. **Cryobiology**, v.66, n.2, p.151-155, 2013.

NARESH, S.; ATREJA, S. K. The protein tyrosine phosphorylation during in vitro capacitation and cryopreservation of mammalian spermatozoa. **Cryobiology**, v.70, p.211-216, 2015.

NAZ, R. K.; RAJESH, P. B. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/ acrosome reaction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.2, n.75, p.1-12, 2004.

NEAGU, V. R.; GARCÍA, B. M.; SANDOVAL, C. S.; RODRÍGUEZ, A. M.; FERRUSOLA, C. O.; FERNÁNDEZ, L. G., *et al.* Freezing dog semen in presence

of the antioxidant butylated hydroxytoluene improves postthaw sperm membrane integrity. **Theriogenology**, v.73, p.645-650, 2010.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Princípios da Bioquímica**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1298 p.

NISHIGAKI, T.; JOSÉ, O.; GONZÁLEZ-COTA, A. L.; ROMERO, F.; TREVIÑO, C. L.; DARSZON, A. Intracellular pH in sperm physiology. **Biochemical and Biophysical Research**, v.450, p.1149-158, 2014.

NOGUEIRA, B. G.; BITENCOURT, J. L.; SAMPAIO, B. F. B.; BENDER, E. S. C.; COSTA E SILVA, E. V.; ZÚCCARI, C. E. S. N. Peroxidação lipídica e agentes antioxidantes no sêmen de mamíferos. **Revista Eletrônica de Veterinaria**, v.15, n.01, p. 1-15, 2013.

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

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.

PAWSON, T. Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. **Cell**, v.116, p.191-203, 2004.

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.

ROCA, J.; GIL, M. A.; HERNANDEZ, M.; PARRILLA, I.; VAZQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. A. Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. **Journal of Andrology**, v.25, p.397-405, 2004.

RUIZ-PESINI, E.; DíEZ-SÁNCHEZ, C.; LÓPEZ-PÉREZ, M. J.; ENRÍQUEZ, J. A. The Role of the Mitochondrion in Sperm Function: Is There a Place for Oxidative Phosphorylation or Is This a Purely Glycolytic Process? **Current Topics in Developmental Biology**, v.77, p.3-19, 2007.

SABEUR, K.; BALL, B. A. Characterization of NADPH oxidase 5 in equine testis and spermatozoa. **Reproduction**, v.134, n.2, p.263-270, 2007.

SHOAE, A.; ZAMIRI, M. J. Effect of butylated hydroxytoluene on bull spermatozoa frozen in egg yolk-citrate extender. **Animal Reproduction Science**, v.104, p.414-418, 2008.

SIKKA, S. C. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. **Current Medical Chemistry**, v.8, p.851-862, 2001.

SIES, H. Oxidative Stress: From Basic Research to Clinical Application. **American Journal of Medicine**, v.91 (suppl 3C), p.31-38, 1991.

TOSHIMORI, K.; ITO, C. Formation and organization of the mammalian sperm head. **Archives Histology Cytology**, v.66, n.5, p.383-396, 2003.

TREMELLEN, K. Oxidative stress and male infertility—a clinical perspective. **Human Reproduction Update**, v.14, n.3, p.243-258, 2008.

TRZCIŃSKA, M.; BRYŁA, M.; GAJDA, B.; GOGOL, P. Fertility of boar semen cryopreserved in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. **Theriogenology**, v.83, p.307-313, 2015.

VARNER, D. D. D.; GIBB, Z.; AITKEN, R. J. Stallion fertility: A focus on the spermatozoon. **Equine Veterinary Journal**, v.47, p.16-24, 2015.

VARNER, D.; JOHNSON, L. From a Sperm's View – Revisiting Our Perception of This Intriguing Cell. **AEEP Proceedings**, v.53, p.104-177, 2007.

YOUSEFIAN, I.; ZARE-SHAHNEH, A.; ZHANDI, M. The Effect of Coenzyme Q10 and α -Tocopherol in Skim Milk-Based Extender for Preservation of Caspian Stallion Semen in Cool Condition. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.34, p.949-954, 2014.

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 (*Bubalus bubalis*) sperm quality following cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v.119, p.183-190, 2010.

WATSON, P. F. The cause of reduced fertility with cryopreserved sêmen. **Animal Reproduction Science**, v.60, p.481-492, 2000.

HIPÓTESE

A adição de BHT nos diluentes aumenta a viabilidade espermática de equinos após a refrigeração e congelação.

OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito dos diluentes contendo BHT sobre a sobrevivência, motilidade espermática, integridade da membrana plasmática e atividade mitocondrial dos espermatozoides equinos antes e após a criopreservação.

OBJETIVOS PARCIAIS

- Avaliar o efeito do antioxidante quanto à sua capacidade de proteger os espermatozoides da ação tóxica das ERO, por meio da avaliação de cinética, integridade de membrana, produção de ERO e peroxidação lipídica;
- Aumentar a resistência do sêmen de garanhões que sabidamente são sensíveis à refrigeração a 5°C e a congelação.

Capítulo 2

BUTIL-HIDROXITOLUENO REDUZ PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO APÓS ESTRESSE EM SÊMEN CRIOPRESERVADO DE EQUINOS

Artigo redigido segundo as normas da Theriogenology, ISSN 0093-691X, ranqueada como A2 pelo QUALIS – CAPES.

(<https://www.elsevier.com/journals/theriogenology/0093-691X/guide-for-authors>)

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram determinar o efeito do Butil-hidroxitolueno (BHT) na qualidade espermática de garanhões, quando submetidos a refrigeração e congelamento, e avaliar sua capacidade em conter a peroxidação lipídica e produção de espécies reativas de oxigênio quando os espermatozoides foram submetidos a estresse. Foram realizados quatro experimentos: (1) a avaliação de diferentes concentrações de BHT em meio diluidor de sêmen equino; (2) a avaliação do efeito da suplementação com BHT em meio de refrigeração sêmen equino; (3) a avaliação do efeito da suplementação com BHT em meio de congelamento de sêmen equino; e (4) Capacidade do BHT conter a peroxidação lipídica e produção de ERO após teste de indução da geração de ERO. Para o experimento 1, não foram observadas diferenças nas avaliações de cinética espermática e integridade de membrana plasmática. Para os experimento 2 e 3, não foram observadas diferenças nas avaliações de cinética espermática e as avaliações de membrana plasmática e acrossomal íntegra (MPAI), Peroxidação lipídica (PER), Produção de espécies reativas de oxigênio em relação ao total de células (CT ERO), avaliando-se o efeito da suplementação com BHT nos meios de refrigeração e congelamento, além disso os animais *Bad Coolers* e *Bad Freezers* não foram beneficiados com a suplementação uma vez que não houve diferença em relação as avaliações realizadas nos animais classificados como *Good Coolers* e *Good Freezers*. No entanto, o no experimento 4 o grupo BHT 0,5 demonstrou valores inferiores de PER (BHT 0,5 - $24,7 \pm 27,0$; Controle - $61,8 \pm 25,6$) e CT ERO (BHT 0,5 - $28,5 \pm 34,4$; Controle - $76,5 \pm 28,0$), em comparação ao grupo controle quando submetido a estresse. Em conclusão, A adição de BHT a uma concentração de 0,5mM não demonstrou influência no

sêmen analisado após 24h de refrigeração e descongelação, nem beneficiou os animais classificados como *Bad Coolers* e *Bad Freezers*, uma vez que não houve estresse oxidativo durante o processo de criopreservação. No entanto, quando os espermatozoides foram submetidos a estresse, o BHT foi capaz de conter a produção de ERO e a cadeia de peroxidação lipídica.

Palavras-chave: antioxidante, diluente, criopreservação; estresse oxidativo.

ABSTRACT

The aim of this study is to determine the effect of butylated hydroxytoluene (BHT) in sperm quality of stallions, when subject to cooling and freezing, and evaluate its capacity to contain the lipid peroxidation and production of reactive oxygen species when the spermatozoa were submitted to stress. Three experiments were performed: (1) evaluation of different concentration of BHT in equine semen extender; (2) evaluation of the effect of supplementation with BHT in equine cooling semen extender; (3) evaluation of the effect of supplementation with BHT in equine freezing semen extender; and (4) BHT capacity contain lipid peroxidation and ROS production after induction test the generation of ROS. For the experiment 1, no differences were observed in evaluations of sperm kinetics and plasma membrane integrity. For the experiments 2 e 3, there were no difference observed in evaluations of Sperm Kinetics and Plasma membrane and Acrosome intact (MPAI), Lipid peroxidation (PER) and Production of reactive oxygen species relative to the total cells (CT ERO), analyzing the effect of supplementation with BHT in cooling and freezing extender, furthermore, animals *Bad Coolers* and *Bad Freezers* were not benefited by supplementation, since there was no difference in the assessments carried out in animals classified as *Good Coolers* and *Good Freezers*. However, in the experiment 4 the group BHT 0,5 showed lower values of PER (BHT 0,5 - $24,7 \pm 27,0$; Control - $61,8 \pm 25,6$) and CT ERO (BHT 0,5 - $28,5 \pm 34,4$; Control - $76,5 \pm 28,0$), compared to the control group when submitted to stress. In conclusion, the addition of BHT at a concentration of 0,5mM has not demonstrated influence on the semen analyzed after 24 hours of cooling and defrosting, neither benefited animals classified as *Bad Coolers* and *Bad Freezers*, since no oxidative stress during the

cryopreservation process. However, when the spermatozoa were subjected to stress, the BHT was able to contain the production of ROS and lipid peroxidation chain.

Keywords: antioxidant, extender, cryopreservation; oxidative stress.

1. Introdução

A criopreservação de sêmen se tornou essencial nos programas de reprodução de equinos em todo mundo, todavia é um processo que confere aos espermatozoides danos à estrutura celular devido ao estresse do processamento [1,2].

A peroxidação lipídica da membrana plasmática foi apontada como um dos principais fatores envolvidos na queda da qualidade espermática, e isso se deve à elevada proporção de ácidos graxos poli-insaturados na membrana; estes são vulneráveis ao ataque de espécies reativas de oxigênio (ERO), afetando a motilidade espermática, bem como a sua capacidade para fertilizar os oócitos [3-6].

Buscando uma maior qualidade espermática durante a criopreservação, substâncias antioxidantes estão sendo adicionadas aos meios diluidores a fim de combater as ERO geradas e, assim, minimizar os danos causados por elas. Dentre os diferentes antioxidantes, o Butil-hidroxitolueno (BHT) é um análogo sintético da vitamina E, cujo efeito protetor é atribuído a dois mecanismos principais: o aumento da fluidez da membrana plasmática após a incorporação do antioxidante, e o segundo por conter a cascata de peroxidação lipídica pela conversão de peroxil em hidroperóxido lipídico. [7].

O efeito do BHT foi avaliado em sêmen de búfalos [8], touros [9,10], bodes [11,12], cães [13] e suínos [14,15], demonstrando aumento na motilidade, integridade de membrana plasmática e viabilidade espermática. Porém, há poucos estudos avaliando a inclusão de BHT em meio diluidor para criopreservação de sêmen equino, necessitando de novas investigações para avaliar sua influência e capacidade de conter o estresse oxidativo.

Os objetivos deste estudo foram determinar a melhor concentração de BHT com base nos parâmetros de cinética e integridade de membrana espermática de

garanhões, seu efeito em espermatozoides submetidos a refrigeração e congelamento, bem como sua influência em espermatozoides de garanhões classificados como *Good* ou *Bad Coolers* e *Good* ou *Bad Freezers*. Além disso, foi objetivo deste trabalho avaliar a capacidade do BHT em conter a peroxidação lipídica e produção de ERO em amostras de sêmen submetidas a estresse.

2. Material e métodos

2.1. Aspectos éticos

O estudo foi realizado de acordo com preceitos éticos recomendados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), após aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) institucional, sob protocolo nº 12/2014.

2.2. Preparo da solução de BHT

Inicialmente preparou-se uma solução de BHT em dimetilsulfóxido (DMSO) a 880mg/mL [13]. Posteriormente, a solução foi acrescentada ao meio Botu-sêmen® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) ou Botu-crio® (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil), a depender se a amostra foi direcionada à refrigeração ou congelamento, de acordo com a concentração de cada grupo experimental.

2.3. Animais

Foram realizados quatro experimentos: (1) avaliação de diferentes concentrações de BHT em meio diluidor de sêmen equino; (2) avaliação do efeito da adição de BHT em meio de refrigeração sêmen equino; (3) avaliação do efeito da adição de BHT em meio de congelamento de sêmen equino; e (4) capacidade do BHT conter a peroxidação lipídica e produção de ERO após teste de indução da geração de ERO. No total foram utilizados 21 garanhões com idade variando entre 5 e 20 anos. Os garanhões ficavam estabulados no local do estudo e receberam feno de Tifton-85, ração e água *ad libitum*.

2.4. Processamento do sêmen

Os ejaculados foram colhidos com vagina artificial (Modelo Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) e filtrados para retirada do gel e de possíveis sujidades. O volume e a concentração espermática foram determinados pela graduação do tubo e contagem das células em câmara de Neubauer, respectivamente.

2.5. Refrigeração do sêmen

As alíquotas destinadas a refrigeração foram diluídas a concentração de 50 milhões (50×10^6) de espermatozoides viáveis por mililitro (mL) e, após as análises espermáticas, permaneceram acondicionadas por 24 horas em sistema de refrigeração passiva para transporte de espermatozoides equinos (Modelo Botu-Flex[®], Botupharma, Botucatu, SP, Brasil), segundo metodologia utilizada por Hartwig et al. [16], até nova avaliação.

2.6. Congelação do sêmen

As amostras destinadas a congelação foram processadas segundo a técnica descrita por Papa et al. [17]. Após a inclusão de diluente a base de leite (Botu-sêmen[®], Botupharma, Botucau, SP, Brasil) numa taxa de 1:1 (vol:vol), as amostras foram centrifugadas a 600xg durante 10min, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspensionado em diluente convencional para congelação (Botu-Crio[®], Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) em uma concentração de 100 milhões (100×10^6) de espermatozoides viáveis por mililitro (mL). O número total de espermatozoides viáveis por palheta de 0,5mL foi de 50×10^6 . As amostras foram refrigeradas a 5°C por 20 minutos em refrigerador com temperatura controlada (Minitub do Brasil Ltda, Porto Alegre, RS, Brasil) e congeladas no vapor de nitrogênio seis centímetros acima do nível de nitrogênio líquido por 20 minutos, e a seguir imersas em nitrogênio e armazenadas em botijão criogênico.

Para avaliação pós-descongelação as palhetas foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos, transferidas para um tubo plástico de 1,5mL e incubadas a 37°C.

2.7. Análises espermáticas

2.7.1. Cinética espermática

Os parâmetros de cinética espermática motilidade espermática total (MT [%]), motilidade espermática progressiva (MP [%]) e porcentagem de espermatozoides com movimento rápido (RAP [%]) foram avaliados por CASA - Computer Assisted Semen Analyzer (HTM-IVOS 12 Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, USA) em cinco campos aleatórios. As configurações do CASA usado neste estudo estão descritas no Quadro 1.

Quadro 1 – Ajuste do HTMA – IVOS – 12 para as realizações das análises seminais em equídeos

Parâmetros	Ajustes
Número de pontos examinados	30
Contraste das células em relação ao campo	60 pixels
Tamanho mínimo das células	3 pixels
Contraste para células móveis	30
Motilidade progressiva	
Retilinearidade	>80%
Velocidade média de percurso	>70µm/s
Static	
Velocidade média de percurso Cutoff	<30m/s
Velocidade em linha reta Cutoff	<20m/s
Espermatozoides Rápidos	
Velocidade média de percurso	>80µm/s
Limite inferior de tamanho	0,62 pixel
Limite superior de tamanho	2,98 pixel
Limite inferior de intensidade	0,24
Limite superior de intensidade	1,19
Limite inferior de alongamento	0%
Limite superior de alongamento	100%
Lentos contados como móveis	Não
Magnificação	1,95

2.7.2. Avaliação por citometria de fluxo

Para a avaliação espermática por citometria de fluxo foi utilizado o equipamento BD LSR Fortessa (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) equipado com laser: azul 488nm, 100mW, vermelho 640nm, 40mW e violeta

405nm, 100mW. Após a análise, os dados foram avaliados por programa do mesmo fabricante BD FACSDiva™ software v6.1.

Para a avaliação de integridade de membrana plasmática e acrossomal (MPAI, %) foi utilizada a associação de sondas iodeto de propídio (IP; P4170, Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil), FITC-PSA (L-0770, Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) e Hoechst 33342 (h342; 14533, Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) de acordo com protocolo desenvolvido por Freitas-Dell'Aqua et al. [18]. Assim, a uma amostra de 200µL de sêmen diluído em meio TALP-PVA, segundo Parrish et al. [19] modificado (100mM NaCl, 3,1mM KCl, 25,0mM NaHCO₃, 0,3mM NaH₂PO₄, 21,6mM DL-lactato de sódio 60%, 2,0mM CaCl₂, 0,4mM MgCl₂, 10,0mM Hepes-livre de ácido, 1,0mM piruvato de sódio, 1,0mg/mL álcool polivinil-PVA e 25µg/mL gentamicina), na concentração de 5x10⁶ espermatozoides/mL foram adicionados 5µL de IP (50µg/mL), 5µL de h342 (100µg/mL) e 0,5µL de FITC-PSA (1mg/mL); em seguida as amostras foram homogeneizadas e incubadas por 15 minutos a 37°C.

A peroxidação lipídica (PER, %) foi avaliada utilizando a sonda C11-BODYPY (D-3861; Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA), de acordo com Guasti et al. [20]. Uma amostra de 489,5µL de sêmen diluído em meio TALP-PVA a uma concentração de 2x10⁶ espermatozoides/mL adicionou-se 0,5µL da sonda C11-BODIPY581/591 (1mg/mL), 5µL de IP (50µg/mL), 5µL de h342 (100µg/mL) e a mistura foi incubada por 30 minutos a 37°C. Após incubação, as amostras foram lavadas 2 vezes a 300g/5min e ressuspensas para 500µL e analisadas por citometria de fluxo.

Para avaliação da concentração de ERO (CT ERO) foi utilizada a sonda 5-(-6) - carboxi-2,7-diclorodihidro-fluoresceindiacetato (carboxi-H₂DCFDA; Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) de acordo com Guthrie e Welch [21], modificada por Papa et al. [22] pela adição de Hoechst 33342. Assim, em 489,5µL de sêmen diluído em TALP-PVA a uma concentração de 2x10⁶ espermatozoides/mL foram acrescidos 5µL de IP (50µg/mL), 5µL de h342 (100µg/mL) e 0,5µL da sonda carboxi-H₂DCFDA (concentração final de 20µM). Esta mistura foi incubada a 25°C por 60 minutos ao abrigo da luz.

2.8. Experimento 1: Avaliação de diferentes concentrações de BHT

Para esse experimento foram utilizados 4 garanhões, dois ejaculados de cada animal, para estabelecer a melhor concentração de BHT. O DMSO foi utilizado como controle do veículo do BHT, para analisar sua influência no espermatozoide. Após a colheita, o sêmen foi processado conforme descrito e dividido em cinco alíquotas diluídas, conforme especificado abaixo:

Controle: Botu-Sêmen®

DMSO: Botu-Sêmen® (100mL) + 37,5µL DMSO

BHT 0,5: Botu-Sêmen® + 0,5mM de BHT

BHT 1,0: Botu-Sêmen® + 1,0mM de BHT

BHT 1,5: Botu-Sêmen® + 1,5mM de BHT

Previamente à refrigeração a 5°C, os parâmetros de cinética espermática foram avaliados conforme mencionado. Por se tratar de uma avaliação preliminar, neste experimento analisou-se a integridade da membrana plasmática (IMP, %) por sondas fluorescentes iodeto de propídio (PI) e diacetato 6-carboxifluoresceína (DCA), de acordo com a técnica descrita por Harrison e Vickers [23], considerando-se intactos espermatozoides PI negativo e DCA positivo. As avaliações foram realizadas antes da refrigeração (T0) e repetidas após 24 horas (T24) de refrigeração a 5°C.

2.9. Experimento 2: Efeito da adição de BHT em meio de refrigeração de sêmen equino

Após determinação da melhor concentração de BHT no experimento 1, 42 ejaculados de 21 animais foram obtidos e cada ejaculado foi dividido em dois grupos: Controle (Botu-Sêmen®) e BHT 0,5 (Botu-Sêmen® + 0,5mM de BHT). As amostras foram avaliadas no momento T0 e após 24h (T24) de refrigeração a 5°C conforme mencionado.

2.9.1. Influência da adição de BHT sobre a qualidade do sêmen refrigerado de garanhões classificados como *Good Coolers* (GC) e *Bad Coolers* (BC)

Para essa avaliação, do total de ejaculados mencionados no experimento 2, obteve-se dois ejaculados de seis garanhões classificados como GC e quatro garanhões classificados como BC, categorização determinada pelo decréscimo da porcentagem de motilidade progressiva após 24h de refrigeração em comparação ao T0. Os animais classificados como GC apresentaram decréscimo $\leq 10\%$ de MP, enquanto os animais classificados como BC apresentaram decréscimo $\geq 30\%$ de MP.

2.10. Experimento 3: Efeito da edição de BHT em meio de congelação de sêmen equino

Neste experimento, 42 ejaculados de 21 animais foram coletados e cada ejaculado foi dividido em dois grupos: Controle (Botu-Crio®) e BHT 0,5 (Botu-Crio® + 0,5mM de BHT). As amostras foram congeladas como descrito e avaliadas nos momentos T0 e pós-descongelação.

2.10.1. Influência da adição de BHT sobre a qualidade do sêmen congelado de garanhões classificados como *Good Freezers* (GF) e *Bad Freezers* (BF)

Para essa avaliação, do total de ejaculados mencionados no experimento 3, obteve-se dois ejaculados de cinco garanhões classificados como GF e nove garanhões classificados como BF, categorização determinada pelo decréscimo da porcentagem de motilidade progressiva pós-descongelação em comparação ao T0. Os animais classificados como GF apresentaram decréscimo $\leq 25\%$ de MP, enquanto os animais classificados como BF apresentaram decréscimo $\geq 40\%$ de MP.

2.11. Experimento 4: Efeito do BHT sobre a peroxidação lipídica e produção de ERO após teste de indução da geração de ERO

Para o teste de indução da geração de ERO, foi utilizado um ejaculado de dez garanhões, sendo que para isso, foi retirada uma amostra de 500µL de sêmen diluído em meio a base de leite na concentração de 50×10^6 espermatozoides/mL de cada grupo experimental (Controle e BHT 0,5mM) e acrescido 50µM de ácido araquidônico por 15 minutos a 37°C. Após esse período, as amostras foram lavadas 2 vezes por centrifugação a 300g por 5 minutos e o pellet diluído em TALP-PVA a uma concentração de 10×10^6 espermatozoides/mL. Então, alíquotas de 500µL desta solução foram utilizadas para a avaliação da peroxidação lipídica e concentração de ERO intracelular, conforme descrito previamente.

2.12. Análises estatísticas

Para todas as análises foram calculadas as medias e desvio padrão e então realizado o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Quando os dados apresentavam distribuição normal foi utilizado um modelo misto de análise de variância (two-way ANOVA) sendo considerados os efeitos de tratamento e do garanhão doador do sêmen seguido pelo teste de Tukey para determinar diferenças entre os grupos. Quando não apresentavam distribuição normal (dados não paramétricos) utilizou-se o teste Kruskal-Wallis seguido de Dunns. Para a avaliação da capacidade antioxidante do BHT após teste de indução da geração de ERO, procedeu-se análise de normalidade e utilizou-se teste “t” quando observada distribuição normal ou quando não paramétrico teste Mann Whitney. Para todos foi considerado valor de $P < 0,05$. As análises foram realizadas pelo Programa GraphPad Prism versão 5.0 para Windows (GraphPad software, San Diego, Califórnia, USA).

3. Resultados

3.1. Experimento 1

Os resultados das avaliações de cinética espermática e integridade de membrana plasmática buscando a melhor concentração de BHT a ser usada no meio diluente estão presentes na tabela 1. Não houve diferença significativa entre os tratamentos.

Tabela 1. Média e desvio padrão dos parâmetros da cinética espermática e integridade de membrana dos grupos controle, DMSO e as diferentes concentrações de BHT (0,5mM, 1,0mM e 1,5mM) avaliados pré-refrigeração (T0) e após 24h de refrigeração (T24)

	T0				
	Controle	DMSO	BHT 0,5	BHT 1,0	BHT 1,5
MT%	87,1±5,0	87,1±5,1	85,8±5,9	88,7±3,9	87,3±4,2
MP%	36,5±7,5	36,2±7,9	36,7±6,1	40,1±8,7	38,5±9,1
RAP%	79,7±8,6	76,5±12,9	79,7±6,5	82,0±4,6	78,3±11,4
IMP%	53,5±9,6	59,0±15,2	56,1±15,5	60,2±14,8	60,0±12,4
	T24				
	Controle	DMSO	BHT 0,5	BHT 1,0	BHT 1,5
MT%	77,7±19,2	79,3±14,3	83,5±12,5	84,8±10,6	74,8±30,1
MP%	40,8±18,4	42,1±16,6	42,2±12,1	42,7±10,9	40,5±19,0
RAP%	66,8±25,9	65,5±23,1	73,8±18,6	75,5±16,8	66,6±30,7
IMP%	42,1±12,4	38,3±11,3	46,8±8,4	42,3±5,2	39,2±19,6

MT: motilidade espermática total; MP: motilidade espermática progressiva; RAP: espermatozoides com movimento rápido; IMP: integridade da membrana plasmática. P>0,05

3.2. Experimento 2

Quando avaliado o efeito da adição de BHT no meio de refrigeração, não observamos diferença significativa entre os grupos controle e BHT 0,5, tanto em T0 como em T24, em relação aos parâmetros de cinética espermática (Tabela 2) e às avaliações de MPAl, PER, CT ERO e CI ERO (Tabela 3). Nas tabelas, observa-se influência da refrigeração nos resultados.

Tabela 2. Média e desvio padrão da cinética espermática dos grupos controle (Botu-Sêmen®) e BHT 0,5mM avaliados pré-refrigeração (T0) e após 24h de refrigeração a 5°C (T24)

	T0		T24	
	Controle	BHT 0,5	Controle	BHT 0,5
MT%	80,0±10,3 ^a	81,9±10,5 ^a	69,0±16,8 ^b	72,0±16,3 ^b
MP%	38,1±9,7 ^{ab}	42,7±11,5 ^a	33,4±14,9 ^b	37,3±14,8 ^{ab}
RAP%	71,1±14,2 ^a	73,2±15,4 ^a	54,0±22,5 ^b	59,1±20,4 ^b

MT: motilidade espermática total; MP: motilidade espermática progressiva; RAP: espermatozoides com movimento rápido

Tabela 3. Média e desvio padrão das avaliações por meio da citometria de fluxo dos grupos controle (Botu-Sêmen®) e BHT 0,5mM analisados pré-refrigeração (T0) e após 24h de refrigeração a 5°C (T24)

	T0		T24	
	Controle	BHT 0,5	Controle	BHT 0,5
MPAI	68,4±8,1 ^{ab}	70,6±8,2 ^a	63,4±12,9 ^c	66,8±11,9 ^{bc}
PER	33,4±33,4 ^a	33,8±33,5 ^a	32,7±31,4 ^a	27,2±30,7 ^a
CT ERO	20,8±27,4 ^a	18,6±26,4 ^a	16,7±26,1 ^a	19,2±25,5 ^a

(MPAI, %) membrana plasmática e acrossoomal íntegra; (PER, %) Peroxidação lipídica; (CT ERO) Produção de ERO em relação ao total de células

3.2.1. Influência da adição de BHT sobre a qualidade do sêmen refrigerado de garanhões classificados como *Good Coolers* (GC) e *Bad Coolers* (BC)

Quando avaliado o efeito da adição de BHT em sêmen de garanhões GC e BC, não houve diferença entre os grupos controle e BHT 0,5 nos momentos T0 e T24 em relação aos parâmetros de cinética espermática (Tabela 4) e os parâmetros avaliados por citometria de fluxo (Tabela 5).

Tabela 4. Média e desvio padrão de cinética espermática dos grupos controle (Botu-Sêmen®) e BHT 0,5mM, pré-refrigeração (T0) e após 24h de refrigeração à 5°C (T24), agrupados em GC (decréscimo na MP $\leq 10\%$) e BC (decréscimo na MP $\geq 30\%$) classificados pela perda de motilidade progressiva após a refrigeração por 24h (T24) em relação ao T0

GC				
	T0		T24	
	Controle	BHT 0,5	Controle	BHT 0,5
MT %	80,1 $\pm$ 13,9 ^a	80,8 $\pm$ 14,3 ^a	80,5 $\pm$ 7,0 ^a	78,8 $\pm$ 11,4 ^a
MP %	34,0 $\pm$ 10,1 ^a	40,7 $\pm$ 13,0 ^{ab}	44,6 $\pm$ 8,1 ^b	42,0 $\pm$ 13,5 ^{ab}
RAP %	73,0 $\pm$ 16,4 ^a	74,0 $\pm$ 17,3 ^a	72,4 $\pm$ 12,1 ^a	67,8 $\pm$ 17,3 ^a
BC				
	T0		T24	
	Controle	BHT 0,5	Controle	BHT 0,5
MT %	76,1 $\pm$ 7,9 ^a	78,2 $\pm$ 8,9 ^a	53,6 $\pm$ 17,3 ^b	59,5 $\pm$ 19,8 ^b
MP %	41,3 $\pm$ 5,9 ^a	42,3 $\pm$ 8,5 ^a	18,8 $\pm$ 7,8 ^b	25,5 $\pm$ 8,6 ^b
RAP %	66,5 $\pm$ 14,1 ^a	67,2 $\pm$ 18,4 ^a	32,6 $\pm$ 18,0 ^b	42,1 $\pm$ 18,2 ^b

MT: motilidade espermática total; MP: motilidade espermática progressiva; RAP: espermatozoides com movimento rápido

Tabela 5. Média e desvio padrão das avaliações por meio da citometria de fluxo dos grupos controle (Botu-Sêmen®) e BHT 0,5mM, pré-refrigeração (T0) e após 24h de refrigeração à 5°C (T24), agrupados em GC (decréscimo na MP $\leq 10\%$) e BC (decréscimo na MP $\geq 30\%$) classificados pela perda de motilidade progressiva após a refrigeração por 24h (T24) em relação ao T0

GC				
	T0		T24	
	Controle	BHT 0,5	Controle	BHT 0,5
MPAI	68,7 $\pm$ 9,2 ^{ab}	70,6 $\pm$ 10,7 ^b	60,8 $\pm$ 15,4 ^a	67,9 $\pm$ 11,0 ^{ab}
PER	50,1 $\pm$ 37,6 ^a	46,9 $\pm$ 37,1 ^a	34,0 $\pm$ 31,5 ^a	37,2 $\pm$ 37,0 ^a
CT ERO	27,3 $\pm$ 32,3 ^a	17,9 $\pm$ 23,9 ^a	32,3 $\pm$ 35,2 ^a	38,0 $\pm$ 25,8 ^a
BC				
	T0		T24	
	Controle	BHT 0,5	Controle	BHT 0,5
MPAI	66,2 $\pm$ 6,8 ^{ac}	68,1 $\pm$ 6,3 ^a	55,3 $\pm$ 11,1 ^b	59,3 $\pm$ 13,5 ^{bc}
PER	24,0 $\pm$ 29,4 ^a	30,7 $\pm$ 33,5 ^a	35,3 $\pm$ 34,8 ^a	21,4 $\pm$ 28,6 ^a
CT ERO	13,6 $\pm$ 16,4 ^a	19,9 $\pm$ 30,5 ^a	3,1 $\pm$ 2,6 ^a	3,0 $\pm$ 2,8 ^a

(MPAI, %) membrana plasmática e acrossomal íntegra; (PER, %) Peroxidação lipídica; (CT ERO) Produção de ERO em relação ao total de células

3.3. Experimento 3

Os resultados apresentados nas tabelas 7 e 8 revelam que não houve influência do BHT (0,5mM) acrescentado ao diluente de congelamento, sobre a cinética espermática e as avaliações de citometria de fluxo (MPAI, PER, CT ERO e CI ERO) respectivamente.

Tabela 6. Média e desvio padrão de cinética espermática dos grupos controle e BHT 0,5 (0,5mM) avaliados pré-congelação (T0) e descongelado

	T0		Descongelado	
	Controle	BHT 0,5	Controle	BHT 0,5
MT %	80,0±10,3 ^a	81,9±10,5 ^a	51,1±17,8 ^b	49,6±18,5 ^b
MP %	38,1±9,7 ^a	42,7±11,5 ^a	22,6±11,5 ^b	23,4±12,6 ^b
RAP %	71,1±14,2 ^a	73,2±15,4 ^a	35,5±18,0 ^b	35,3±18,5 ^b

MT: motilidade espermática total; MP: motilidade espermática progressiva; RAP: espermatozoides com movimento rápido

Tabela 7. Média e desvio padrão das avaliações por meio da citometria de fluxo dos grupos controle (Botu-Crio®) e BHT 0,5mM avaliados pré-congelação (T0) e descongelado

	T0		Descongelado	
	Controle	BHT 0,5	Controle	BHT 0,5
MPAI	68,0±8,1 ^a	70,2±8,2 ^a	20,8±8,6 ^b	19,5±9,7 ^b
PER	34,6±33,4 ^a	34,8±33,5 ^a	42,0±23,8 ^a	37,7±24,8 ^a
CT ERO	20,9±27,4 ^a	18,9±26,4 ^a	11,1±19,1 ^{ab}	4,8±13,3 ^b

(MPAI, %) membrana plasmática e acrossomal íntegra; (PER, %) Peroxidação lipídica; (CT ERO) Produção de ERO em relação ao total de células

3.3.1. Influência da adição de BHT sobre a qualidade do sêmen congelado de garanhões classificados como *Good Freezers* (GF) e *Bad Freezers* (BF)

Os resultados de cinética (Tabela 9), integridade de membrana plasmática e acrossomal, peroxidação lipídica e produção de ERO (Tabela 10) em animais GF e BF também não demonstraram diferença significativa entre os grupos controle e tratado (com adição de 0,5mM de BHT).

Tabela 8. Média e desvio padrão de cinética espermática dos grupos controle (Botu-Crio®) e BHT 0,5mM, pré-congelação (T0) e descongelado, agrupados em GF (decréscimo na MP $\leq 25\%$) e BF (decréscimo na MP $\geq 40\%$) classificados pela perda de motilidade progressiva após a descongelação em relação ao T0

GF				
	T0		Descongelado	
	Controle	BHT 0,5	Controle	BHT 0,5
MT %	88,2 $\pm$ 6,4 ^a	90,4 $\pm$ 5,3 ^a	69,6 $\pm$ 5,1 ^b	66,6 $\pm$ 11,0 ^b
MP %	39,6 $\pm$ 4,9 ^{ab}	47,6 $\pm$ 6,9 ^b	34,3 $\pm$ 5,7 ^a	36,1 $\pm$ 10,3 ^a
RAP %	82,4 $\pm$ 6,1 ^a	86,1 $\pm$ 5,2 ^a	54,6 $\pm$ 8,9 ^b	55,0 $\pm$ 11,0 ^b

BF				
	T0		Descongelado	
	Controle	BHT 0,5	Controle	BHT 0,5
MT %	74,7 $\pm$ 10,7 ^a	76,3 $\pm$ 11,8 ^a	37,8 $\pm$ 14,9 ^b	41,1 $\pm$ 17,0 ^b
MP %	35,2 $\pm$ 9,7 ^a	39,0 $\pm$ 11,8 ^a	13,5 $\pm$ 6,1 ^b	14,8 $\pm$ 6,9 ^b
RAP %	65,3 $\pm$ 13,4 ^a	65,9 $\pm$ 15,7 ^a	22,2 $\pm$ 12,7 ^b	23,8 $\pm$ 12,6 ^b

MT: motilidade espermática total; MP: motilidade espermática progressiva; RAP: espermatozoides com movimento rápido

Tabela 9. Média e desvio padrão das avaliações por meio da citometria de fluxo dos grupos controle (Botu-Crio®) e BHT 0,5mM, pré-congelação (T0) e descongelado, agrupados em GF (decréscimo na MP $\leq 25\%$) e BF (decréscimo na MP $\geq 40\%$) classificados pela perda de motilidade progressiva após a descongelação em relação ao T0

GF				
	T0		Descongelado	
	Controle	BHT 0,5	Controle	BHT 0,5
MPAI	70,3 $\pm$ 7,1 ^a	72,6 $\pm$ 7,6 ^a	19,5 $\pm$ 7,2 ^b	18,5 $\pm$ 8,8 ^b
PER	30,8 $\pm$ 32,5 ^a	34,0 $\pm$ 33,1 ^a	45,4 $\pm$ 15,3 ^a	47,4 $\pm$ 20,4 ^a
CT ERO	11,1 $\pm$ 14,0 ^a	5,5 $\pm$ 6,5 ^a	10,3 $\pm$ 18,1 ^a	2,6 $\pm$ 2,0 ^a

BF				
	T0		Descongelado	
	Controle	BHT 0,5	Controle	BHT 0,5
MPAI	66,5 $\pm$ 8,4 ^a	67,7 $\pm$ 9,3 ^a	20,2 $\pm$ 8,8 ^b	20,1 $\pm$ 10,9 ^b
PER	34,3 $\pm$ 36,1 ^a	33,4 $\pm$ 35,5 ^a	52,0 $\pm$ 23,9 ^a	43,9 $\pm$ 23,3 ^a
CT ERO	23,8 $\pm$ 29,0 ^a	20,9 $\pm$ 26,4 ^a	12,2 $\pm$ 19,6 ^{ab}	2,0 $\pm$ 3,9 ^b

(MPAI, %) membrana plasmática e acrossomal íntegra; (PER, %) Peroxidação lipídica; (CT ERO) Produção de ERO em relação ao total de células

3.4. Experimento 4

Avaliando-se a capacidade do BHT em conter a peroxidação lipídica e produção de ERO após teste de indução da geração de ERO, observou-se diferença significativa entre os grupos controle e BHT 0,5 na PER, CT ERO e CI ERO (Tabela 6).

Tabela 10. Média e desvio padrão das avaliações por meio da citometria de fluxo dos grupos controle (Botu-Sêmen®) e BHT 0,5mM analisados após indução da geração de ERO com adição de ácido araquidônico por 15 minutos a 37°C

	Controle	BHT 0,5
PER	61,8±25,6 ^a	24,7±27,0 ^b
CT ERO	76,5±28,0 ^a	28,5±34,4 ^b

(PER, %) Peroxidação lipídica; (CT ERO) Produção de ERO em relação ao total de células

4. Discussão

A avaliação da concentração ideal de BHT para a refrigeração de sêmen equino é fundamental, uma vez que a geração controlada de ERO está associada com eventos de sinalização e regulação de funções fisiológicas normais, como capacitação, hiperativação espermática e reação acrossomal, interferindo diretamente nos resultados de fertilidade [24,25]. Sendo assim, a adição excessiva de antioxidantes nos diluentes pode neutralizar o estresse oxidativo, mas também pode interferir no papel fisiológico das ERO, resultando em baixos índices reprodutivos.

No experimento 1 foram testadas as concentrações de 0,5, 1,0 e 1,5mM de BHT, sobre as células espermáticas. Diferentemente dos resultados encontrados neste trabalho, Ball et al. [26] ao testar as concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0mM em sêmen de equino, observaram que em todas as concentrações houve redução significativa da motilidade progressiva em comparação ao grupo controle. Essa redução foi dose dependente (diretamente proporcional), demonstrando maior influência das doses mais elevadas na qualidade espermática. Portanto, o BHT 0,5mM foi considerada a concentração preferível a ser utilizada nos experimentos subsequentes deste estudo, uma vez que não houve diferença em relação aos outros grupos.

Com relação a influência da refrigeração nos resultados, observa-se decréscimo na cinética, porém não se verifica diferença na peroxidação lipídica e produção de ERO entre os momentos T0 e T24, contradizendo a afirmação de vários autores que relacionam o estresse oxidativo como fator limitante para o sucesso da criopreservação [1, 2].

Uma vez que não houve diferença nos parâmetros de oxidação nos grupos controle e tratado entre os momentos T0 e T24, observa-se que a redução do

metabolismo dos espermatozoides influenciaram na produção de ERO e por consequência a peroxidação lipídica, havendo outros mecanismos de decréscimo da qualidade espermática.

Graham [27] relata que entre 8°C e 19°C os fosfolipídios de membrana celular sofrem uma fase de transição, passando de um estado líquido para um estado gel, que predispõe a rupturas, comprometendo o funcionamento celular. Esse processo pode interferir na qualidade espermática mesmo na ausência de estresse oxidativo, promovendo uma queda na motilidade espermática causada por depleção de ATP, devido desestruturação de enzimas importantes para o metabolismo energético [28].

Kankofer et al. [29] avaliaram a intensidade da peroxidação lipídica no sêmen de garanhão armazenado a 5°C e concluíram que a peroxidação lipídica não aumenta substancialmente durante a refrigeração, comprovando indiretamente que não houve aumento de produção de ERO.

Durante o processo de criopreservação, o fator indivíduo é o principal responsável pela qualidade e longevidade espermática em equinos [30]. Devido a este fator, Hartwig et al. [16] classificaram os garanhões em GC e BC, de acordo com a resistência espermática após a refrigeração. Essa diferença pode ser atribuída à composição lipídica da membrana, que varia entre indivíduos da mesma espécie. Nesse sentido, esperávamos que o BHT beneficiasse o grupo de animais classificados como BC, uma vez que reduziria os danos à membrana promovidos pela cascata de peroxidação lipídica e aumentaria a fluidez, promovendo maior resistência; no entanto, esta hipótese não se confirmou.

Quando avaliado o efeito da adição de BHT ao meio de refrigeração, não foi observada diferença significativa entre os grupos controle e BHT 0,5 nos resultados de cinética e avaliações por citometria de fluxo. Isso corrobora com os achados de Kankofer et al. [29], que sugerem que a atividade da glutathione peroxidase, superóxido dismutase e catalase contidas no sêmen refrigerado a 5°C de garanhões são suficientes para evitar a formação excessiva de ERO durante o armazenamento por um período de 24h, em que a célula diminui seu metabolismo. No entanto, quando os espermatozoides são submetidos a desafios, em situações de estresse como aquecimento e dentro do trato reprodutivo da égua, ocorrerá aumento das ERO e o diluente contendo BHT poderá expressar seu potencial em conter os danos.

Os animais classificados como GC e BC divergiram nos resultados de cinética e avaliações por meio da citometria de fluxo, demonstrando concordância com os aspectos discutidos anteriormente. Os animais classificados como BC demonstraram redução na cinética após 24h de refrigeração, no entanto houve redução na produção de ERO, justificando-se pela baixa resistência das membranas e por serem espermatozoides metabolicamente menos ativos que os espermatozoides advindos de animais classificados como GC [31].

Quando avaliado o efeito da adição de BHT ao meio de congelação de sêmen equino, não se observou diferença significativa entre os tratamentos. Isto se deve, provavelmente, à interação do BHT com a gema de ovo do diluente, uma vez que o antioxidante é um composto lipossolúvel e, após sua interação uma pequena quantidade permanece disponível para penetrar a membrana espermática e executar sua função [32, 8]. Esta hipótese é embasada nos resultados de Khalifa et al. [33] que, ao criopreservar sêmen de caprinos, obtiveram os melhores resultados com diluente a base de gema de ovo numa concentração de 5,0mM de BHT; porém, quando criopreservados em diluentes sem inclusão de gema de ovo a melhor concentração foi bem inferior, apenas 0,3mM.

Esperava-se que o BHT beneficiasse, principalmente, o grupo de animais classificados como BF, uma vez que reduziria os danos a membrana, promovidos pela cascata de peroxidação lipídica, e aumentaria a fluidez promovendo maior resistência. No entanto, observa-se mais uma vez que a queda na qualidade espermática não está diretamente associada a estresse oxidativo e sim, a redução da integridade das membranas que afeta por consequência a cinética espermática, em ambos os grupos de animais.

Analisando-se a influência do processo de congelação nos resultados obtidos nos dois grupos experimentais observa-se, queda na motilidade e MPAl, porem nenhuma variação na peroxidação lipídica ao comparar T0 e descongelado, o que nos leva a crer que o estresse oxidativo não é o principal problema na criopreservação de sêmen de equino, uma vez que houve baixa concentração de ERO nas avaliações por citometria de fluxo. Esses resultados contradizem o que está descrito na literatura que considera a redução na motilidade, viabilidade, integridade acrossomal e no potencial de fertilização em

virtude da peroxidação lipídica desencadeada pelas ERO durante o processo de congelação do sêmen [2, 14 34, 35].

A redução na concentração de ERO é justificada, uma vez que a criopreservação leva a célula a um estado de quiescência, reduzindo seu metabolismo, os gastos energéticos e, por consequência, a produção de ERO [1]. Nesse sentido, a peroxidação lipídica permaneceu estável porque não houve aumento de ERO, que são os desencadeadores de uma sequência de reações que culmina com a destruição da estrutura da membrana, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e morte da célula [36].

A queda na cinética pode ter ocorrido devido a diminuição na integridade da membrana, que sofre fragilização durante a fase de transição do estado líquido para gelatinoso no processo de criopreservação. Essa hipótese é confirmada por Alvarez e Storey [37], que ao avaliar criodanos subletais em espermatozoides humanos, concluíram que o estresse sofrido pela membrana promoveu danos, ao contrário da peroxidação lipídica que não contribuiu para que isso ocorresse.

O estresse térmico promove decréscimo irreversível da motilidade espermática, mudanças bioquímicas e funcionais nos espermatozoides, devido um rearranjo de alguns fosfolipídios da membrana plasmática, alterando suas propriedades biológicas básicas como permeabilidade seletiva e difusão lateral de proteínas [38].

Neste sentido a composição lipídica da membrana assume um papel importante, pois estudos prévios indicaram que a proporção colesterol/fosfolipídios da membrana plasmática é um fator determinante na fluidez e estabilidade durante a criopreservação [16]. Qualquer alteração na fluidez promove áreas de fragilidade na membrana, sujeitas a rupturas e permeabilidade a íons, como cálcio [39].

Avaliando-se os resultados dos grupos controle e tratado descongelados, mesmo não havendo diferença significativa, observa-se uma redução na produção de ERO no grupo tratado. Possivelmente, após o aquecimento e reativação metabólica da célula, o BHT que foi incorporado a membrana atuará controlando a produção de peróxido de hidrogênio e reduzirá, posteriormente, a peroxidação lipídica que será desencadeada. Projetando essa ação do antioxidante para o momento em que o espermatozoide seja exposto a um

ambiente hostil que é o trato reprodutivo da fêmea, o espermatozoide suplementado poderá resultar em melhor fertilidade, hipótese que necessita ser comprovada.

Para avaliar a capacidade do BHT conter a peroxidação lipídica e produção de ERO, os espermatozoides foram expostos ao ácido araquidônico com o intuito de promover estresse às células, aumentando a geração de ERO. O ácido araquidônico atua na cadeia de transporte de elétrons, localizada na membrana mitocondrial interna, promovendo uma descarga significativa de radicais superóxido para o espaço intermembranas [40].

Os resultados demonstraram que o BHT foi capaz de conter a produção de ERO e a peroxidação lipídica em condição de estresse, o que pode indiretamente possibilitar uma maior longevidade destes espermatozoides. Este resultado comprova a hipótese de o estresse oxidativo ser um problema após o descongelamento e introdução no trato reprodutivo feminino e não durante a criopreservação como está descrito. Com isso a incorporação de antioxidantes aos meios diluentes visam um efeito protetor tardio, principalmente os antioxidantes lipossolúveis que são incorporados às membranas, como o BHT.

Em conclusão, a adição de BHT a uma concentração de 0,5mM não demonstrou influência no sêmen analisado após 24h de refrigeração e descongelação, nem beneficiou os animais classificados como BC e BF, uma vez que não houve estresse oxidativo durante o processo de criopreservação. No entanto, quando os espermatozoides foram submetidos a estresse, o BHT foi capaz de conter a produção de ERO e a cadeia de peroxidação lipídica.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo apoio financeiro (Processo 2014/00175-8) e a Botupharma por fornecer os diluentes de sêmen.

REFERÊNCIAS

[1] Watson PF. The cause of reduced fertility with cryopreserved sêmen. *Animal Reproduction Science* 2000;73:481-492.

- [2] Ball BA. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science* 2008;107:257–267.
- [3] Aurich C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 2005;89(1-4):65-75.
- [4] Ortega Ferrusola C, Gonzalez Fernandez L, Morrell JM, Salazar Sandoval C, Macias Garcia B, Rodriguez-Martinez H, Tapia JA, Peña FJ. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. *Reproduction* 2009;138:55–63.
- [5] Macías García B, Gonzalez Fernandez L, Ortega Ferrusola C, Salazar-Sandoval C, Morillo Rodriguez A, Rodriguez Martinez H, Tapia J, Morcuende D, Peña F. Membrane lipids of the stallion spermatozoon in relation to sperm quality and susceptibility to lipid peroxidation. *Reproduction in Domestic Animal* 2011;46:141–148.
- [6] Guthrie HD, Welch GR. Effects of reactive oxygen species on sperm function. *Theriogenology* 2012;78(8):1700-1708.
- [7] Aitken RJ, Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of spermatozoa preparation techniques. *Journal of Andrology* 1988;9(6):367-376.
- [8] Ijaz A, Hussain A, Aleem M, Yousaf MS, Rehman H. Butylated hydroxytoluene inclusion in semen extender improves the post-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology* 2009;71:1326-1329.
- [9] Shoaie A, Zamiri MJ. Effect of butylated hydroxytoluene on bull spermatozoa frozen in egg yolk-citrate extender. *Animal Reproduction Science* 2008;104:414-418.
- [10] Ansari MS, Rakha BR, Akhter S. Effect of Butylated Hydroxytoluene Supplementation in Extender on Motility, Plasmalemma and Viability of Sahiwal Bull Spermatozoa. *Pakistan Journal of Zoology* 2011;43(2):311-314.
- [11] Memon AA, Wahid H, Rosnina Y, Goh YM, Ebrahimi M, Nadia FM, Audrey G. Effect of butylated hydroxytoluene on cryopreservation of Boer goat semen in Tris egg yolk extender. *Animal Reproduction Science* 2011;129:44-49.
- [12] Naijian HR, Kohram H, Shahneh AZ, Sharafi M, Bucak MN. Effects of different concentrations of BHT on microscopic and oxidative parameters of Mahabadi goat semen following the freeze–thaw process. *Cryobiology* 2013;66(2):151-155.
- [13] Neagu VR, García BM, Sandoval CS, Rodríguez AM, Ferrusola CO, Fernández LG, *et al.* Freezing dog semen in presence of the antioxidant butylated

hydroxytoluene improves postthaw sperm membrane integrity. *Theriogenology* 2010;73:645-650.

[14] Roca J, Gil MA, Hernandez M, Parrilla I, Vazquez JM, Martinez EA. Survival and fertility of boar spermatozoa after freeze-thawing in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *Journal of Andrology* 2004;25:397-405.

[15] Trzcińska M, Bryla M, Gajda B, Gogol P. Fertility of boar semen cryopreserved in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. *Theriogenology* 2015;83:307-313.

[16] Hartwig FP, Lisboa FP, Hartwig FP, Monteiro GA, Maziero RRD, Freitas-dell'aqua CP, Alvarenga MA, Papa FO, Dell'aqua jr JA. Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: An alternative for bad cooler stallions. *Theriogenology* 2014;81(2):340–346.

[17] Papa FO, Melo CM, Fioratti EG, Dell'Aqua Jr. JA, Zahn FS, Alvarenga MA. Freezing of stallion epididymal sperm. *Animal Reproduction Science* 2008;107:293–301.

[18] Freitas-dell'aqua CP, Guasti PN, Monteiro GA, Maziero RRD, Dell'aqua jr JA, Papa FO. Flow cytometric analysis of fertile and subfertile frozen stallion spermatozoa. *Animal Reproduction* 2012;9:941.

[19] Parrish JJ, Susko-parrish J, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology of Reproduction* 1988;38:1171-1180.

[20] Guasti PN, Freitas-dell'aqua CP, Maziero RRD, Monteiro GA, Hartwig FP, Lisboa FP, Papa PM, Papa FO. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide from subfertile stallion spermatozoa during storage at refrigeration temperature. In: 39th Annual Conference of the IETS, 2012, Hannover. *Reproduction, Fertility and Development* 2012;25:20.

[21] Guthrie HD, Welch GR. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll treated viable boar sperm using fluorescence activated flow cytometry. *Journal of Animal Science* 2006;84:2089-2100.

[22] Papa PM, Maziero RRD, Guasti PN, Junqueira CR, Freitas-dell'aqua CP, Papa FO, Vianna FP, Alvarenga MA, Crespilho AM, Dell'aqua JÁ. Effect of glycerol on the viability and fertility of cooled bovine semen. *Theriogenology* 2015;83:107-113.

[23] Harrison RA, Vickers SE. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 1990;88:343-452.

[24] Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies-morel MCG. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity,

mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. *Journal of Andrology* 2000;21:895-902.

[25] Kothari S, Thompson A, Agarwal A, Du plessis SS. free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian Journal of Experimental Biology* 2010;48:425-435.

[26] Ball BA, Medina V, Gravance CG, Baumber J. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5°C. *Theriogenology* 2001;56:577-589.

[27] Graham JK. Cryopreservation of stallion spermatozoa. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 1996;12:131–147.

[28] De Lamirande E, Gagnon C. Reactive Oxygen Species and Human Spermatozoa. I. Effects on the Motility of Intact Spermatozoa and on Sperm Axonemes. *Journal of Anthology* 1992;13(5):368-378.

[29] Kankofer M, Kolm G, Aurich J, Aurich C. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5 °C. *Theriogenology* 2005;63:1354–1365.

[30] Aurich C. Recent advances in cooled-semen technology. *Animal Reproduction Science* 2008;107:268–275.

[31] Gibb Z, Lambourne SR, Aitken RJ. The Paradoxical Relationship Between Stallion Fertility and Oxidative Stress. *Biology of Reproduction* 2014;91(3):77, 1–10.

[32] Killian G, Honadel T, Mcnutt T, Henault M, Wegner C, Dunlap D. Evaluation of butylated hydroxytoluene as a cryopreservative added to whole or skim milk diluent for bull semen. *Journal of Dairy Science* 1989;72:1291-1295.

[33] Khalifa TA, Lymberopoulos AG, El-Saidy BE. Testing usability of butylated hydroxytoluene in conservation of goat semen. *Reproduction in Domestic Animals* 2008;43:525–30.

[34] Neid DM, Gadella BM, Collenbrander B, Agüero A, Brouwers JFHM. Lipid peroxidation in stallion spermatozoa. *Theriogenology* 2002;58:295-298.

[35] Silva SV, Guerra MMP. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 2011;35:370-384.

[36] Repetto MG, Ferrarotti NF, Boveris A. The involvement of transition metal ions on iron-dependent lipid peroxidation. *Archives of Toxicology* 2010;84:255-262.

[37] Alvarez JG, Storey BT. Evidence that membrane stress contributes more than lipid peroxidation to sublethal cryodamage in cryopreserved human sperm:

Glycerol and other polyols as sole cryoprotectant. *Journal of Andrology* 1993;14:199–209.

[38] Amann RP, Pickett BW. Principal of cryopreservation and areview of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science* 1987;7:145–173.

[39] Hammerstedt RH, Graham JK, Nalam JP. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive? *Journal of Andrology* 1990;11:73-88.

[40] Aitken RJ, Smith TB, Lord T, Kuczera L, Koppers AJ, Naumovski N, Connaughton H, Baker MA, De Iuliis GN. On methods for the detection of reactive oxygen species generation by human spermatozoa: analysis of the cellular responses to catechol oestrogen, lipid aldehyde, menadione and arachidonic acid. *Andrology* 2013;1:192–205.