UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

ESTUDO SOBRE A REDUÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM SÊMEN EQUINO A PARTIR DA ADIÇÃO DE QUERCETINA NOS DILUENTES DE REFRIGERAÇÃO E CONGELAÇÃO

Luis Fernando Mercês Chaves Silva

Botucatu - SP
Abril/2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

ESTUDO SOBRE A REDUÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM SÊMEN EQUINO A PARTIR DA ADIÇÃO DE QUERCETINA NOS DILUENTES DE REFRIGERAÇÃO E CONGELAÇÃO

LUIS FERNANDO MERCÊS CHAVES SILVA

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Animal, Área de Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

Botucatu - SP
Abril/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

Silva, Luis Fernando Mercês Chaves.
Estudo sobre a redução do estresse oxidativo em sêmen equino a partir da adição de quercetina nos diluentes de refrigeração e congelação / Luis Fernando Mercês Chaves Silva. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Orientador: Frederico Ozanam Papa
Capes: 50504002

1. Stress oxidativo. 2. Sêmen. 3. Equino - Reprodução. 4. Criopreservação. 5. Preservação do sêmen. 6. Quercetina - Biotecnologia. 7. Antioxidantes.

Palavras-chave: Antioxidantes; Criopreservação; Garanhão; Quercetina; Sêmen.

Nome do autor: Luis Fernando Mercês Chaves Silva

Título: ESTUDO SOBRE A REDUÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM SÊMEN EQUINO A PARTIR DA ADIÇÃO DE QUERCETINA NOS DILUENTES DE REFRIGERAÇÃO E CONGELAÇÃO

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa
Presidente e orientador
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ - UNESP - Botucatu /SP

Prof. Dr. José Antônio Dell'Aqua Junior
Membro
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ – UNESP - Botucatu /SP

Prof. Dr. André Maciel Crespilho
Membro
Universidade de Santo Amaro – UNISA, Campus 1 – São Paulo /SP

Data da Defesa: 27 de abril de 2016.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Estrutura do espermatozoide.....16

FIGURA 2 - Disposição dos compartimentos mitocondriais.....17

FIGURA 3 - Redução da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo oxidada (NAD^+) à nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzida (NADH), ao receber um íon hidreto (**:**H^+).....19

FIGURA 4 - Esquematização da conversão de uma molécula de glicose à duas moléculas de piruvato durante a glicólise.....19

FIGURA 5 - Esquematização do complexo piruvato-desidrogenase. Conversão de duas moléculas de Piruvatos em duas Acetil CoA, promovendo a formação de dois NADH.....20

FIGURA 6 - Redução do flavina-adenina-dinucleotídeo (FAD) à flavina-adenina-dinucleotídeo reduzida ($FADH_2$), a partir da recepção de dois elétrons de dois prótons (H^+).....21

FIGURA 7 - Reação global do ciclo do ácido cítrico. Formação de três NADH e uma $FADH_2$ a partir de uma molécula de Acetil CoA.....21

FIGURA 8 - Disposição dos complexos enzimáticos (I, II, III e IV) responsáveis pela cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria.....22

FIGURA 9 - Complexo I: Transferência de elétrons e prótons (H^+) da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzida (NADH) à ubiquinona (Q), formando ubiquinol (QH_2).....24

FIGURA 10 - Complexo II: Redução da ubiquinona (Q) ao ubiquinol (QH_2), a partir da transferência de elétrons e prótons (H^+) da flavina-adenina-dinucleotídeo reduzida ($FADH_2$).....24

FIGURA 11 - Complexo III: Transferência de elétrons do ubiquinol (QH_2) aos citocromos C (Cit C).....25

FIGURA 12 - Complexo IV: Trânsito de elétrons dos citocromos C (Cit C) em direção ao oxigênio (O_2), convertendo este à água (H_2O).....26

FIGURA 13 - Esquematização da formação da adenosina trifosfato (ATP) durante a fosforilação oxidativa.....27

FIGURA 14 - Formação do radical superóxido (O_2^-) a partir da incorporação de um elétron livre ao oxigênio (O_2).....29

FIGURA 15 - Esquematização da formação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), através da ação da superóxido dismutase (SOD).....30

FIGURA 16 - Formação do radical hidroxil ($OH^\bullet$) através da reação de Fenton..30

FIGURA 17 - Formação do radical hidroxil ($OH^\bullet$) através da reação de Haber-Weiss.....31

FIGURA 18 - Esquematização da reação em cadeia ocorrida durante a peroxidação lipídica.....34

FIGURA 19 - Desestabilização do hidroperóxido lipídico (ROOH) por ação dos íons metálicos (Fe^{2+}/Cu^+ ou Fe^{3+}/Cu^{2+}).....34

FIGURA 20 - Ação da glutationa-peroxidase (GPx) na remoção do peróxido de hidrogênio (H_2O_2).....37

FIGURA 21 - Conversão de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) à água (H_2O) e oxigênio (O_2) por ação da catalase (CAT).....37

FIGURA 22 - Estrutura molecular da quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona).....40

FIGURA 23 - Ação da quercetina estabilizando os radicais superóxido (O_2^-) ou hidroxil ($OH^\bullet$), a partir da transferência de um elétron e um próton (H^+).....40

FIGURA 24. Esquematização da função da quercetina como quelante do íon férrico (Fe^{2+}).....41

FIGURA 25 - Bloqueio à reação em cadeia durante a peroxidação lipídica por ação da quercetina, ao doar um elétron e um próton (H^+) ao radical peroxil ($ROO^\bullet$) formando hidroperóxido lipídico (ROOH).....41

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Acetil-CoA	acetil coenzima A
ADP	adenosina difosfato
ATP	adenosina trifosfato
CAT	catalase
Cit C	citocromo C
CO_2	dióxido de carbono
DNA	ácido desoxirribonucleico
EROs	espécies reativas do oxigênio
FAD	flavina-adenina-dinucleotídeo
$FADH_2$	flavina-adenina-dinucleotídeo reduzida
GPx	glutationa-peroxidase
GSH	glutationa reduzida
GSSG	glutationa oxidada
H_2O	molécula de água
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
H	átomo de hidrogênio
H_2	molécula de hidrogênio
H^+	próton ou próton de hidrogênio
$:H^+$	íon hidreto
NAD^+	nicotinamida-adenina-dinucleotídeo oxidada
NADH	nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzida
O_2	molécula de oxigênio
O_2^-	íon superóxido

OH	hidroxila
$OH^{\bullet}$	radical hidroxil
Pi	fosfato inorgânico
Q	ubiquinona
QH_2	ubiquinol
Q^{-}	ânion semiquinona
$R^{\bullet}$	radical alquil
$RO^{\bullet}$	radical alcoxil
$ROO^{\bullet}$	radical peroxil
ROOH	hidroperóxido lipídico
SOD	superóxido dismutase

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1.....13
1. INTRODUÇÃO.....14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....15
2.1. ESPERMATOZOIDE.....15
2.2. MEMBRANA PLASMÁTICA.....16
2.3. MITOCÔNDRIA.....17
2.4. METABOLISMO ENERGÉTICO DOS ESPERMATOZOIDES 18
2.4.1. GLICÓLISE.....18
2.4.2. COMPLEXO PIRUVATO-DESIDROGENASE.....19
2.4.3. CICLO DO ÁCIDO CÍTRICO.....20
2.4.4. CADEIA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS.....22
2.4.5. FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA.....26
2.5. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs).....27
2.6. PRINCIPAIS EROs.....29
2.6.1. RADICAL SUPERÓXIDO (O_2^-).....29
2.6.2. PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H_2O_2).....29
2.6.3. RADICAL HIDROXIL ($OH^\bullet$).....30
2.7. AÇÃO DAS EROs NO ORGANISMO.....31
2.8. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....33
2.9. CRIOINJÚRIAS E EROs.....34
2.10. PRINCIPAIS ANTIOXIDANTES E SUAS FUNÇÕES.....36
2.10.1. ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS.....36
2.10.2. ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICOS.....38
2.11. QUERCETINA.....39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....44
HIPÓTESE.....54
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....54
CAPÍTULO 2.....55
ARTIGO 1 – MECANISMOS DE AÇÃO DOS PRINCIPAIS ANTIOXIDANTES UTILIZADOS NA CRIOPRESERVAÇÃO ESPERMÁTICA DE GARANHÕES.....56
ARTIGO 2 – Redução do estresse oxidativo no sêmen criopreservado de garanhões a partir da incorporação da quercetina ao meio diluidor.....74

RESUMO

SILVA, L.F.M.C. ESTUDO SOBRE A REDUÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM SÊMEN EQUINO A PARTIR DA ADIÇÃO DE QUERCETINA NOS DILUENTES DE REFRIGERAÇÃO E CONGELAÇÃO. Botucatu – SP. 2016, 94p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

O surgimento das biotecnologias aplicadas ao sêmen equino, como a refrigeração e congelação, representaram um grande avanço para equinocultura, principalmente por permitir um melhor aproveitamento do ejaculado, otimizando a utilização de animais considerados geneticamente superiores. Entretanto a aplicação dessas técnicas imprime estresse térmico às células espermáticas, resultando em injúrias físicas e químicas, dentre elas uma elevação significativa na produção de espécies reativas do oxigênio (EROs). Quando em excesso, estes agentes instáveis são capazes de reagir e promover lesão às enzimas, lipídeos de membrana e ácidos nucleicos, reduzindo a viabilidade dos espermatozoides criopreservados. Desta maneira surge a necessidade de se introduzir elementos que desempenhem função antioxidante nos meios de refrigeração e congelação. A quercertina, um polifenol do grupo dos flavonoides, é considerada um poderoso antioxidante por reduzir o surgimento das principais EROs, quelar íons metálicos formadores de radicais livres e estabilizar a peroxidação lipídica. Apesar disto, a eficiência da aplicação deste antioxidante sobre o ejaculado equino durante o processo de criopreservação ainda é controversa e pouco referenciada, sendo necessário mais estudos para que se determine a influência de sua utilização no ejaculado de garanhões durante a refrigeração e congelação.

Palavras-chave: antioxidante; criopreservação; sêmen; flavonoide; garanhão.

ABSTRACT

SILVA, L.F.M.C. STUDY ABOUT THE REDUCTION OF OXIDATIVE STRESS IN EQUINE SEMEN FROM THE ADDITION OF QUERCETIN ON COOLING AND FREEZING EXTENDERS. Botucatu – SP. 2016, p.94. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

The emergence of biotechnologies applied to the equine semen as cooling and freezing process represented a major breakthrough for Equine, especially for allowing a better use of the ejaculate, optimizing the use of genetically superior animals. However the application of these techniques induces thermal stress on sperm cells, resulting in physical and chemical injuries, among them a significant rise in the production of reactive oxygen species (ROS). These unstable agents when in excess, are able to react and promote damage to enzymes, lipid membrane and nucleic acids, thereby reducing the viability of cryopreserved sperm. Thus is required to introduce elements that perform antioxidant function in cooling and freezing extenders. The quercertina, a polyphenol of the flavonoids group, is considered a potent antioxidant by reducing the emergence of the main ROS, chelate metal ions producers of free radicals and stabilize the lipid peroxidation. Despite this, the efficiency of application of this antioxidant on the equine ejaculate during the process of cryopreservation is still controversial and poorly referenced, requiring further studies in order to determine if there is influence of their use in the ejaculate of stallions during cooling and freezing.

Keywords: antioxidants; cryopreservation; semen; flavonoids; stallion

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

A reprodução na espécie equina, na maioria das raças, é realizada com utilização de sêmen criopreservado. Para isto são realizadas biotécnicas como refrigeração e congelação de sêmen, que se baseiam na manutenção do material genético por tempo prolongado pela preservação através do frio (NOURI et al., 2013).

Entretanto, diferente de outras espécies, o equino geralmente não é selecionado com base na sua capacidade reprodutiva, sendo muitas vezes levado em consideração exclusivamente a sua performance atlética ou características fenotípicas, em detrimento de sua qualidade seminal, havendo um grande número de garanhões com sêmen sensível à criopreservação (BRITO, 2007; MORILLO-RODRÍGUEZ et al., 2012).

A manipulação do sêmen equino durante os processos de refrigeração e congelação, reduz a viabilidade espermática e fertilidade, principalmente em decorrência do processo de peroxidação que ocorre à membrana lipídica das células, em virtude da alta susceptibilidade à ação das espécies reativas do oxigênio (EROs) (GARCIA et al., 2011).

Quando em pequenas quantidades, as EROs são necessárias aos processos fisiológicos como a capacitação espermática, entretanto, passam a ter um efeito prejudicial quando ocorre um aumento excessivo na sua produção, levando os espermatozoides ao estresse oxidativo (FORD, 2004; ANDRADE et al., 2010).

Desta maneira é necessário introduzir elementos que desempenhem função antioxidante nos meios utilizados para a refrigeração e congelação espermática, visando conter a elevação exacerbada dos níveis dos agentes oxidantes.

Várias substâncias com função antioxidante são referenciadas na literatura, dentre elas a quercetina, um flavonoide do grupo dos compostos polifenólicos, é apontada pela sua capacidade de reduzir os danos oxidativos sofridos pelas células (BEHLING et al., 2004; LIU et al., 2010). Esta é apontada por interromper a peroxidação lipídica, reagir com íons metálicos reduzindo a formação das EROs e interagir com os principais agentes oxidantes inativando-os (AFANAS'EV et al., 1989). Apesar disto, resultados conflitantes são encontrados

quanto à utilização deste antioxidante no sêmen dos mamíferos e pouco se sabe sobre seu impacto quando adicionado aos meios de refrigeração e congelação na espécie equina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. O ESPERMATOZOIDE

O espermatozoide é uma célula altamente especializada com a função de fertilizar e transferir o material genético masculino (VARNER et al., 2015). Este é completamente envolvido por uma membrana e dividido em quatro compartimentos, acrossoma, cabeça, peça intermediária e flagelo, em que cada estrutura desempenha um papel importante para o funcionamento da célula espermática (DOWSETT et al., 1984; PESCH; BERGMANN, 2006; VARNER et al., 2015) (Figura 1).

No equino, a cabeça do espermatozoide assume uma disposição oval e alongada. É o compartimento responsável pelo armazenamento do material genético a ser propagado e nela está contida a cromatina condensada composta de ácido desoxirribonucleico (DNA), que ocupa a maior parte deste compartimento (GADELLA et al., 2001; TOSHIMORI; ITO, 2003; RUIZ-PESINI et al., 2007).

O acrossoma é uma cobertura de dupla camada com essencial função durante a fertilização. Armazena em seu conteúdo acrosina, hialuronidase e outras enzimas hidrolíticas essenciais para penetração do espermatozoide no oócito, ocupando 2/3 da dimensão da cabeça no espermatozoide equino (BRITO, 2007; VARNER et al., 2015).

A unidade responsável pelo movimento da célula, é a cauda do espermatozoide, a qual é dividida em peça principal e peça terminal. A sua porção inicial é composta por bainha fibrosa envolvendo nove fibras densas, nove pares de microtúbulos periféricos conectados por dineínas e um par central de microtúbulos. As dineínas utilizam a energia gerada pela hidrólise da adenosina trifosfato (ATP) para promover o deslocamento dos microtúbulos, movimentando a cauda. Já em sua porção terminal, a cauda é desprovida de

bainha fibrosa e fibras densas, restando apenas os pares de microtúbulos e dineínas (BRITO, 2007; RUIZ-PESINI et al., 2007).

Entre a cabeça e a cauda há a peça intermediária. Sua estrutura é semelhante à peça principal da cauda, possuindo como diferencial a ausência da bainha fibrosa e, principalmente, a presença de uma bainha mitocondrial composta por unidades produtoras de energia, as mitocôndrias (GADELLA et al., 2001; VARNER et al., 2015) (Figura 1).

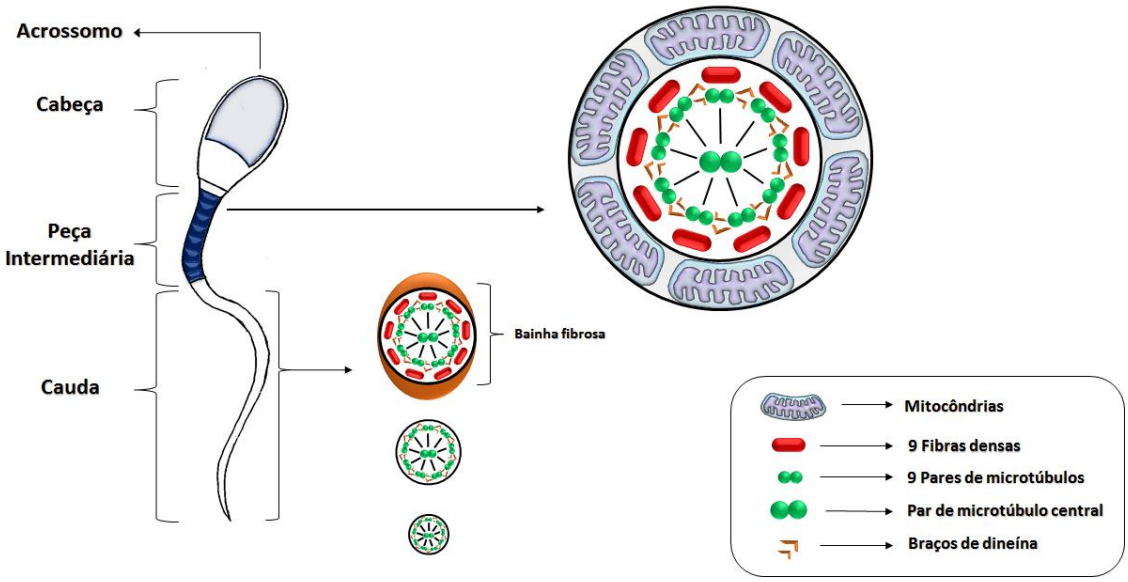

FIGURA 1. Estrutura do espermatozoide. (Autoria própria)

2.2. MEMBRANA PLASMÁTICA

As células eucarióticas, assim como suas organelas, são envolvidas por membranas que se dispõem em uma bicamada fosfolipídica, composta por moléculas de ácidos graxos saturados e insaturados ligados a grupamentos fosfato (ROBERTSON, 1981). Esta estrutura em bicamada garante às membranas a formação de extremidades polares que são hidrofílicas assim como um centro apolar e hidrofóbico, conferindo às células e organelas impermebilidade à maioria dos solutos polares (OLIVEIRA et al., 2013; NELSON; COX, 2014).

Também estão presentes nas membranas algumas proteínas que podem ser integrais ou periféricas e desempenham funções como transporte de substâncias entre o meio interno e externo, atividade metabólica com função

enzimática, reconhecimento celular e permitem ligações entre células (ROBERTSON, 1981; OLIVEIRA et al., 2013).

A membrana plasmática é responsável pela preservação da homeostase celular e de suas organelas, condição fundamental para sobrevivência e manutenção do potencial de fertilização das células espermáticas, sendo a integridade funcional das membranas dos espermatozoides considerada crucial para os processos de capacitação, reação acrossomal e adesão ao oócito (FLESCH; GADELLA, 2000).

2.3. MITOCÔNDRIA

As mitocôndrias, nas células espermáticas, encontram-se exclusivamente na peça intermediária e são estruturas responsáveis pela produção da maior parte da energia necessária para a movimentação dos espermatozoides, tendo como fonte principal de energia a metabolização dos substratos da glicose (BRITO, 2007).

Esta organela é composta de duas membranas, uma externa permeável às moléculas consideradas pequenas (Mr<5.000) e à ions que transitam livremente através de estruturas denominadas de porinas, e uma membrana interna, mais seletiva e impermeável à maioria destas moléculas pequenas e íons (RAJENDER et al., 2010; VENDITTI et al., 2013; NELSON; COX, 2014) (Figura 2).

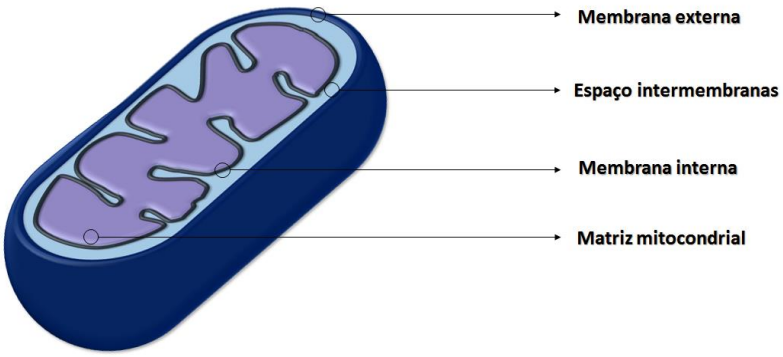

FIGURA 2. Disposição dos compartimentos mitocôndriais. (Autoria própria)

2.4. METABOLISMO ENERGÉTICO DOS ESPERMATOZOIDES

Para as células espermáticas dos equinos, a glicose é a principal fonte de energia, tendo em vista que os espermatozoides nesta espécie são ineficientes em metabolizar a frutose (VARNER; JOHNSON et al., 2007). Por uma série de reações executadas principalmente nas mitocôndrias, a glicose ($C_6H_{12}O_6$) é convertida a seis moléculas de dióxido de carbono (CO_2), seis moléculas de água (H_2O) e 32 moléculas de ATP.

Tendo como objetivo final a produção de energia, a molécula de glicose e seus substratos passarão por cinco etapas importantes, a glicólise, complexo piruvato-desidrogenase, ciclo do ácido cítrico, seguido da cadeia de transporte de elétrons e, por fim, a fosforilação oxidativa, gerando a ATP necessário para a movimentação e manutenção das células espermáticas (NELSON; COX, 2014).

2.4.1. GLICÓLISE

A glicólise é considerada a etapa anaeróbica do processo de metabolização da glicose, ocorre no citoplasma celular e se divide em duas fases. A fase preparatória, na qual são consumidas duas moléculas de ATP (doadores de grupos fosforil), se convertendo a duas moléculas de adenosina difosfato (ADP) e fase de pagamento em que são produzidas quatro moléculas de ATP, resultando em um saldo final positivo de duas moléculas de ATP (KRESGE et al., 2005; PELICANO et al., 2006).

Com o desfecho da fase preparatória são formadas também duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato. Estas entrarão na fase de pagamento e inicialmente sofrerão, dentre outras, a reação de desidrogenação, onde por ação das desidrogenases são removidos dois átomos de hidrogênio (H) na forma de hidrogênio molecular (H_2). O H_2 sofre quebra na sua estrutura, resultando em um próton de hidrogênio (H^+) que é liberado no meio e o outro H^+ conjugado a um par de elétrons na forma de íon hidreto ($:H^+$), que é carreado por uma coenzima específica a nicotinamida-adenina-dinucleotídeo oxidada (NAD^+). Esta coenzima tem a função de transportar os elétrons e os H^+ liberados nas reações de desidrogenação, convertendo-se à nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzida (NADH) e posteriormente se direcionar à cadeia de transporte de elétrons (NAGY

et al., 2000; KRESGE et al., 2005; PELICANO et al., 2006; VENDITTI et al., 2013) (Figura 3).

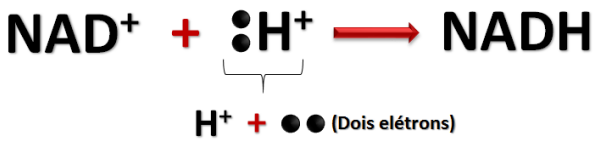

FIGURA 3. Redução da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo oxidada (NAD^+) à nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzida (NADH), ao receber um íon hidreto ($:H^+$). (Autoria própria)

Ao fim da glicólise são formadas duas moléculas de NADH e duas de piruvato ($C_3H_4O_3$), este composto armazena grande parte da energia ainda não produzida pelo processo de metabolização da glicose, seguindo em direção ao complexo piruvato-desidrogenase (PELICANO et al., 2006; NELSON; COX, 2014) (Figura 4).

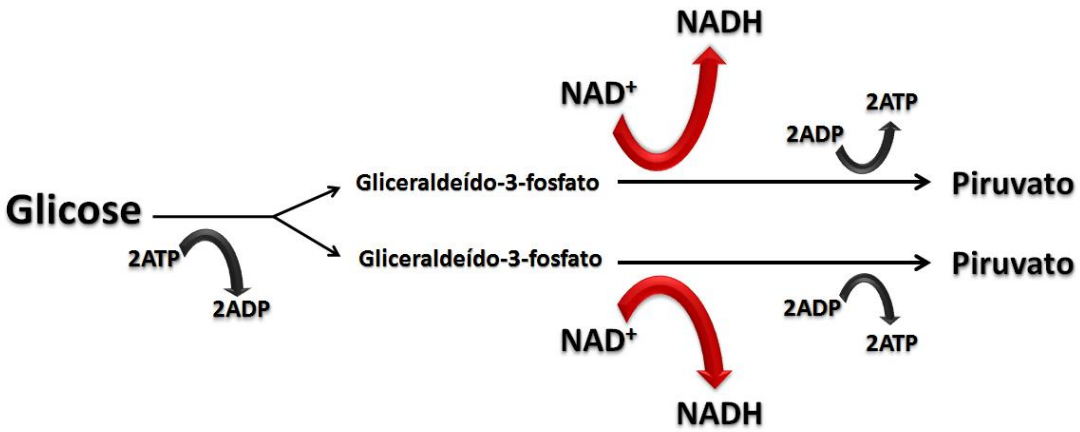

FIGURA 4. Esquematização da conversão de uma molécula de glicose à duas moléculas de piruvato durante a glicólise. (Autoria própria)

2.4.2. COMPLEXO PIRUVATO-DESIDROGENASE

Esta etapa do metabolismo da glicose ocorre na matriz mitocondrial, na qual as duas moléculas de piruvato serão convertidas a duas moléculas de acetil coenzima A (acetil-CoA). Esta conversão ocorre pelo processo de descarboxilação oxidativa, havendo a remoção de um grupo carboxil ($O=C–O^-$)

na forma de CO_2, e os dois carbonos remanescentes são convertidos à uma molécula de acetil-CoA (PATEL; KOROTCHKINA, 2001; STRUMIŁO, 2005; NELSON; COX, 2014).

Além da formação de duas moléculas de acetil-CoA e duas moléculas de CO_2, são formados dois NADH, a partir da transferência de dois **:**H^+, resultantes de reação de desidrogenação, à duas moléculas de NAD^+ (PATEL; KOROTCHKINA, 2001) (Figura 5).

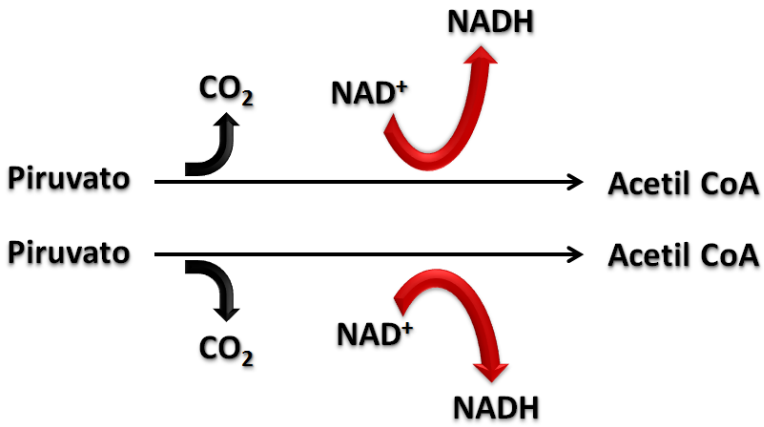

FIGURA 5. Esquematização do complexo piruvato-desidrogenase. Conversão de duas moléculas de Piruvatos em duas Acetil CoA, promovendo a formação de dois NADH. (Autoria própria)

2.4.3. CICLO DO ÁCIDO CÍTRICO

Para que seja extraído o seu potencial energético, a acetil-CoA precisa ser completamente oxidada à CO_2, transferindo elétrons e íons H^+ a coenzimas. Para isto, as duas moléculas de acetil-CoA resultantes do complexo piruvato desidrogenase vão participar, na matriz mitocondrial, do ciclo do ácido cítrico ou ciclo de Krebs (NELSON; COX, 2014).

Neste processo, cada molécula de acetil-CoA vai ser condensada a uma molécula de oxaloacetato, catalisado pela enzima citrato-sintase, formando um composto de seis carbonos, o citrato, que será submetido a mais oito reações, dentre esta, duas descarboxilações oxidativas, havendo formação de duas moléculas de CO_2. Ocorrem também quatro reações de desidrogenação onde são liberados H^+ e elétrons para coenzimas, como o NAD^+ e a flavina-adenina-dinucleotídeo (FAD) (ROMANO; CONWAY, 1996; BERTRAM et al., 2006; NAZARET et al., 2009).

O FAD assim como o NAD^+, é uma coenzima responsável por carrear elétrons e átomos de hidrogênio para a cadeia de transporte de elétrons. Esta ao receber dois H^+ e dois elétrons do succinato (intermediário no ciclo de Krebs) se converte à flavina-adenina-dinucleotídeo reduzida ($FADH_2$) (BERTRAM et al., 2006; VENDITTI et al., 2013) (Figura 6).

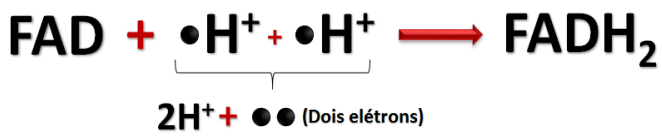

FIGURA 6. Redução da flavina-adenina-dinucleotídeo (FAD) à flavina-adenina-dinucleotídeo reduzida ($FADH_2$), a partir da recepção de dois elétrons de dois prótons (H^+). (Autoria própria)

Cada acetil-CoA que participa do ciclo do ácido cítrico gera três NADH e uma molécula de $FADH_2$, coenzimas que irão participar da etapa seguinte do metabolismo, a cadeia de transporte de elétrons (BERTRAM et al., 2006; SOKIC-LAZIC; MINTEER, 2008) (Figura 7).

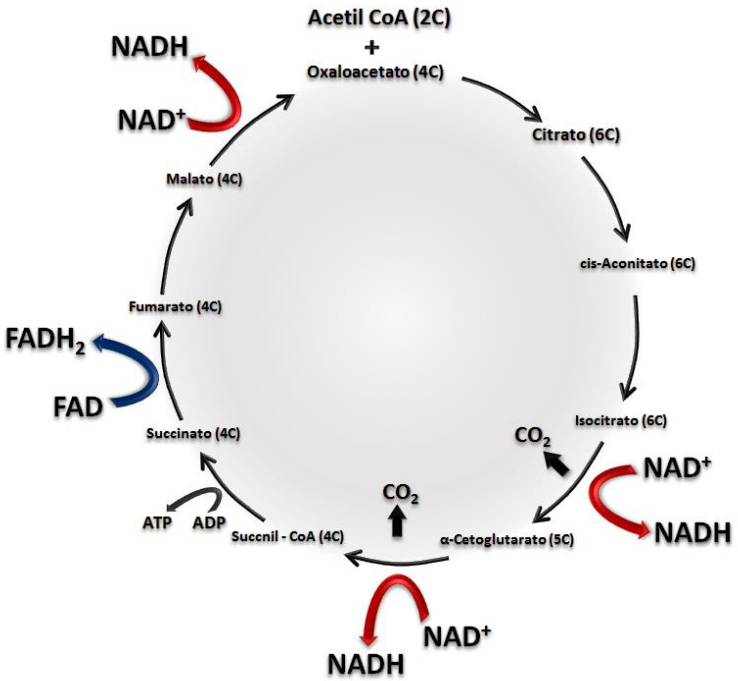

FIGURA 7. Reação global do ciclo do ácido cítrico. Formação de três NADH e uma $FADH_2$ a partir de uma molécula de Acetil CoA. (Autoria própria)

2.4.4. CADEIA DE TRANSPORTE DE ELÉTRONS

A cadeia de transporte de elétrons uma etapa regida por reações que ocorrem nos diversos complexos enzimáticos inclusos na membrana interna da mitocôndria. Ao todo são quatro complexos compostos por proteínas que têm a função de permitir e auxiliar no transporte de elétrons dentro da cadeia, resultando na transferência de energia para fosforilação oxidativa e síntese de ATP (RAHA; ROBINSON, 2000; LENAZ et al., 2007; NAVARRO; BOVERIS, 2007) (Figura 8).

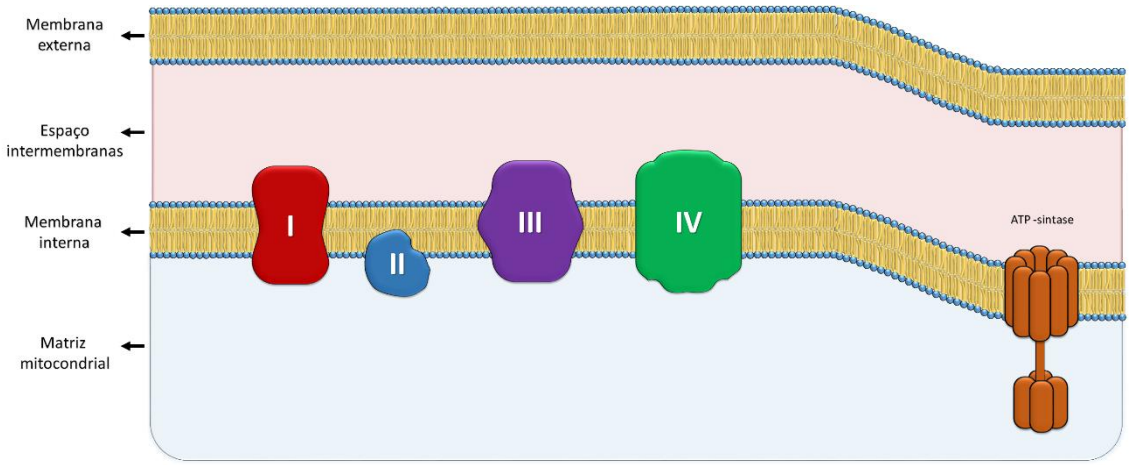

FIGURA 8. Disposição dos complexos enzimáticos (I, II, III e IV) responsáveis pela cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria. (Autoria própria)

Nesta etapa, os NADH e os $FADH_2$ que foram produzidos nas reações anteriores vão liberar seus H^+ e seus elétrons, visando a produção de ATP. Foram produzidas 10 moléculas de NADH, duas durante a glicólise, duas a partir das duas moléculas de piruvato no complexo piruvato-desidrogenase e seis durante as reações de metabolismo das duas moléculas de acetil-CoA no ciclo do ácido cítrico. Além disto foram produzidas duas moléculas de $FADH_2$ no ciclo do ácido cítrico.

Cada molécula de NADH assim como de $FADH_2$ carreia dois elétrons na sua estrutura, que serão transferidos a aceptores intermediários no processo e tem como aceptor final o oxigênio (O_2). Além da transferência de elétrons a partir

dos complexos enzimáticos, há a mobilização de H^+ entre a matriz mitocondrial e o espaço intermembranas, este fluxo posteriormente será fundamental na síntese de ATP (VENDITTI et al., 2013).

A matriz mitocondrial está repleta de prótons resultantes das reações de desidrogenação que ocorrem dentro deste compartimento da mitocôndria e estes H^+ são incapazes de migrar passivamente através da membrana interna da mitocôndria em virtude de sua impermeabilidade à maioria dos íons. Diante disto, os complexos da cadeia de transporte de elétrons conduzem estes prótons para o espaço intermembranas mitocondrial de maneira ativa, ou seja, com gasto da energia gerada pela passagem dos elétrons através dos complexos (RAJENDER et al., 2010; VENDITTI et al., 2013).

O complexo I é representado por uma grande enzima composta por 42 cadeias de polipeptídios, neste sítio cada molécula de NADH será reoxidada à NAD^+ após a transferência de dois elétrons e um H^+ a uma outra coenzima, a ubiquinona (Q), que assim como os NAD^+ e os FAD, é capaz de carrear elétrons e prótons, além de ser pequena e hidrofóbica, o que permite a esta migrar através da bicamada lipídica, dando curso à transferência dos elétrons ao longo da cadeia (LENAZ et al., 2007; PRYDE; HIRST, 2011; VENDITTI et al., 2013) (Figura 9).

Ao receber os dois elétrons e um próton do NADH e subsequentemente retirar um H^+ da matriz mitocondrial, a Q é completamente reduzida à ubiquinol (QH_2), seguindo então para o complexo III da cadeia respiratória através da bicamada lipídica. A energia gerada a partir da transferência dos elétrons do NADH à Q permite ao complexo I mobilizar, contra o gradiente eletroquímico, quatro H^+ da matriz mitocondrial ao espaço intermembranas (RAHA; ROBINSON, 2000; LENAZ, 2001; LENAZ et al., 2007) (Figura 9).

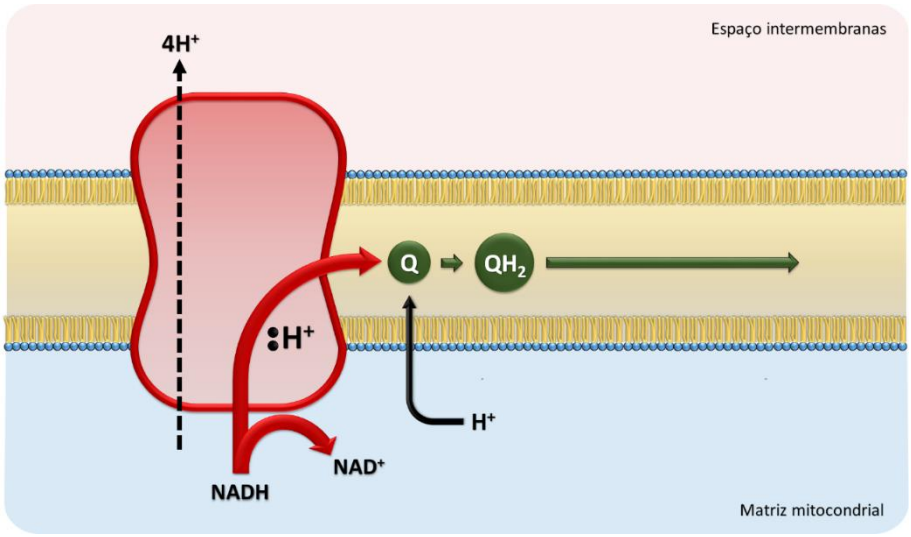

FIGURA 9. Complexo I: Transferência de elétrons e prótons (H^+) da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzida (NADH) à ubiquinona (Q), formando ubiquinol (QH_2). (Autoria própria)

No complexo II, cada molécula de $FADH_2$ que recebeu dois elétrons e dois H^+ do succinato, no ciclo do ácido cítrico, vai ser reoxidada à FAD após transferir seus elétrons e prótons à Q, formando assim o QH_2 que, como na etapa anterior, segue ao complexo III. Neste complexo não há o deslocamento de H^+ da matriz em direção ao espaço intermembranas (LENAZ et al., 2007; QUINLAN et al., 2012; VENDITTI et al., 2013) (Figura 10).

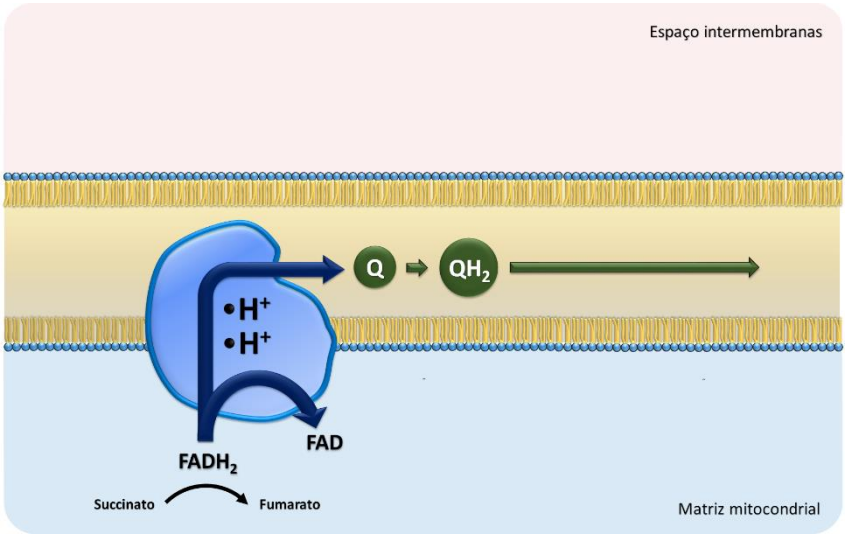

FIGURA 10. Complexo II: Redução da ubiquinona (Q) ao ubiquinol (QH_2), a partir da transferência de elétrons e prótons (H^+) da flavina-adenina-dinucleotídeo reduzida ($FADH_2$). (Autoria própria)

Os dois elétrons carreados pelo QH_2, saídos tanto do complexo I quanto do complexo II, são transferidos a duas moléculas de citocromos C (Cit C), no complexo III, estes Cit C são proteínas responsáveis pelo transporte de elétrons em direção ao complexo IV. Nesta etapa também são mobilizados quatro H^+ ao espaço intermembranas, sendo dois destes provenientes da matriz mitocondrial e os outros dois derivados do QH_2 (RAHA; ROBINSON, 2000; LENAZ, 2001; CROFTS et al., 2006; LENAZ et al., 2007; VENDITTI et al., 2013) (Figura 11).

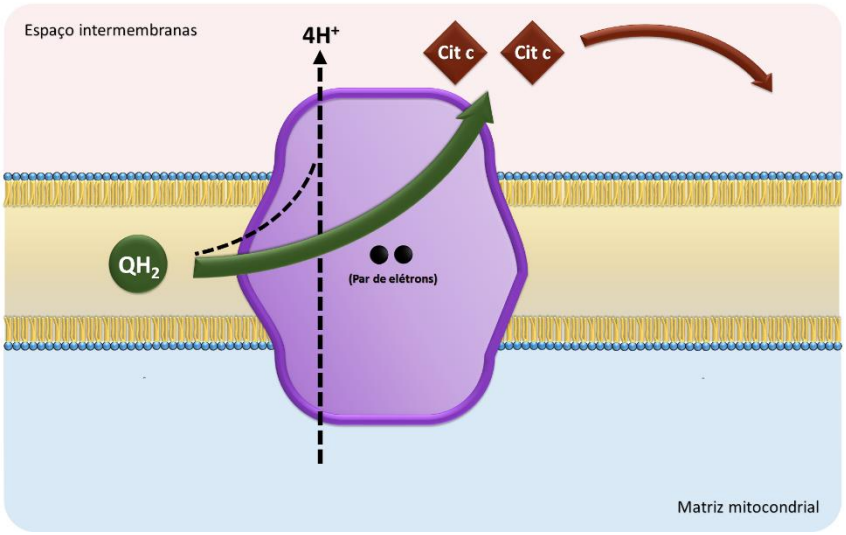

FIGURA 11. Complexo III: Transferência de elétrons do ubiquinol (QH_2) aos citocromos C (Cit C). (Autoria própria)

O complexo IV é uma enzima grande, composta de 13 subunidades. Neste complexo as moléculas de Cit C vão transferir seus elétrons ao seu aceptor final, o O_2. Este necessita de quatro elétrons, provenientes dos Cit C, e quatro H^+, que estão presentes na matriz mitocondrial, para formar duas moléculas de H_2O, concluindo a cadeia de transporte de elétrons. Além disto nesta etapa, a capacidade energética dos elétrons já está reduzida, logo cada elétron que passa pelo complexo gera energia para mobilizar apenas um H^+ em direção ao espaço intermembranas, resultando que o par de elétrons transportado pelos dois Cit C levam a migração de apenas dois H^+ ao espaço intermembranas da mitocôndria (TURRENS, 2003; ANDRADE et al., 2010; VENDITTI et al., 2013) (Figura 12).

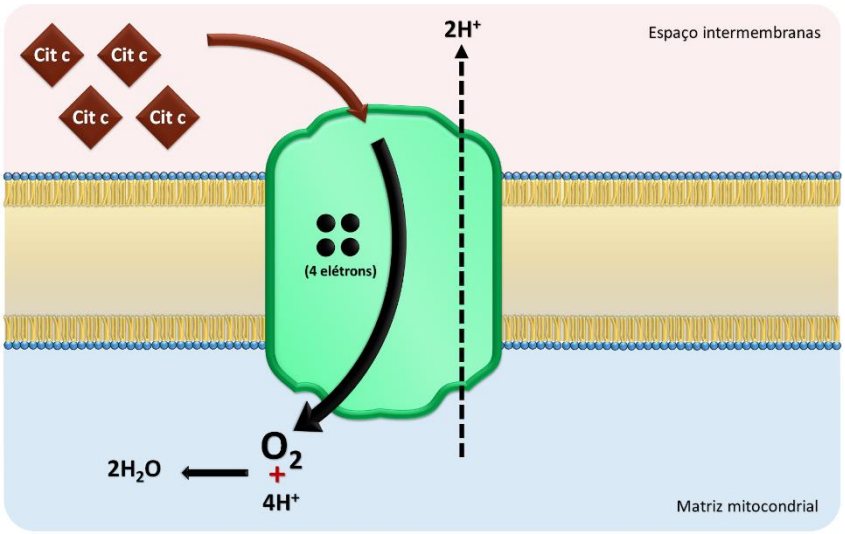

FIGURA 12. Complexo IV: Trânsito de elétrons dos citocromos C (Cit C) em direção ao oxigênio (O_2), convertendo este à água (H_2O). (Autoria própria)

Ao término da cadeia de transporte de elétrons, haverá a formação de moléculas de H_2O na matriz mitocondrial e os H^+ mobilizados ao espaço intermembranas vão participar da síntese de ATP na fosforilação oxidativa (HALLIWELL, 2006; RAJENDER et al., 2010).

2.4.5. FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA

O fluxo de prótons através da membrana interna da mitocôndria é responsável pela formação das moléculas de ATP, isto é permitido em vista da diferença de cargas existente entre o espaço interno e externo da membrana, havendo uma tendência de migração dos H^+ do espaço intermembranas em direção à matriz mitocondrial (SARASTE, 1999; BERTRAM et al., 2006). Estes prótons podem adentrar à matriz mitocondrial por dois compartimentos distintos, pela fosfato-translocase ou pela da ATP-sintase (CAPALDI, 1982) (Figura 13).

A fosfato-translocase permite que um H^+ adentre à matriz mitocondrial carregando consigo um fosfato inorgânico (Pi), que é necessário para que a ADP seja convertida à ATP; já a ATP-sintase é responsável por gerar energia, e esta depende da migração de três H^+ em direção à matriz mitocondrial, portanto são necessárias quatro moléculas de H^+ por ATP gerada (CAPALDI, 1982; WALKER et al., 1995; PRYDE; HIRST, 2011) (Figura 13).

Ao fim da fosforilação oxidativa, são geradas 28 moléculas de ATP a partir dos dez NADH e dois $FADH_2$ provenientes das etapas anteriores, resultando na produção de 32 ATPs após completa metabolização da glicose (NELSON; COX, 2014).

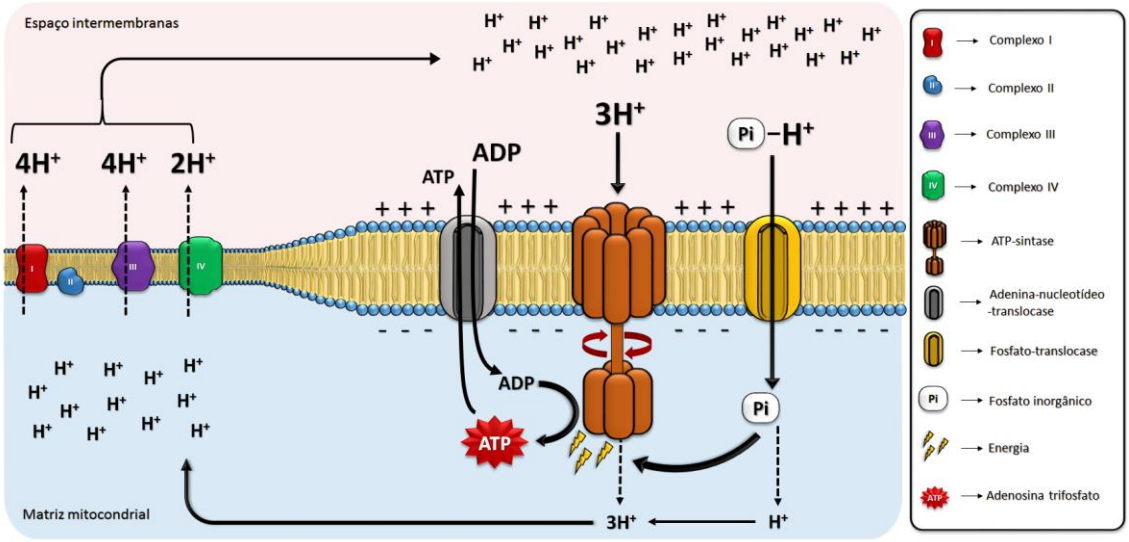

FIGURA 13. Esquematização da formação da adenosina trifosfato (ATP) durante a fosforilação oxidativa. (Autoria própria)

2.5. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs)

Os radicais livres são definidos como qualquer espécie química que possui em sua estrutura molecular um ou mais elétrons desemparelhados, desta forma não possuem estabilidade, sendo altamente reativos e capazes de gerar danos a qualquer molécula biológica. Quando sua origem decorre de reações envolvendo o O_2, são denominadas espécies reativas do oxigênio (EROs) (MAIA; BICUDO, 2009; NOGUEIRA et al., 2013).

A mitocôndria é o principal local de produção das EROs, durante o trânsito dos elétrons entre os seus carreadores na cadeia de transporte, pode ocorrer de um destes elétrons desemparelhar e reagir com uma molécula de O_2, dando origem a radicais instáveis (FINKEL; HOLBROOK, 2000; TURRENS, 2003; LAMBERT; BRAND, 2004b; ANDREYEV et al., 2005).

Através da transferência do par de elétrons dos NADH e $FADH_2$ às Q, nos complexos I e II, respectivamente, assim como durante a transferência dos elétrons dos QH_2 aos Cit C, no complexo III, há a formação de um radical

intermediário, o ânion semiquinona (Q^{-}) que eventualmente é capaz de transferir este elétron desemparelhado ao O_2, levando à formação do radical superóxido (O_2^{-}) (TURRENS et al., 1985; KOZLOV et al., 1999; FINKEL; HOLBROOK, 2000; HERRERO; BARJA, 2000; RAHA; ROBINSON, 2000; TURRENS, 2003; PRYDE; HIRST, 2011; QUINLAN et al., 2012).

Aparentemente este é o principal mecanismo responsável pela produção de EROs e sua ocorrência é mais comum nos complexos I e III, atribuindo-se uma probabilidade de efusão de elétrons, duas vezes maior ao complexo III quando comparado ao complexo I (TURRENS; BOVERIS, 1980; FINKEL; HOLBROOK, 2000; RAHA; ROBINSON, 2000; KUSSMAUL; HIRST, 2006).

É sugerido também que no complexo I há a possibilidade de formação de O_2^{-} quando ocorre um transporte reverso dos elétrons, retornando aos NAD^{+}, nestas circunstâncias durante o retorno dos elétrons pode haver o desvencilhamento de um deles reagindo com os O_2 (LIU et al., 2002; LAMBERT; BRAND, 2004a; TREBERG et al., 2011).

A ocorrência de EROs no complexo IV é menos provável, embora durante a síntese de H_2O a partir do O_2 ocorra a formação de radicais intermediários reativos, estes permanecem fortemente ligados ao complexo até que seja formada a molécula de H_2O, além disto, neste sítio existem enzimas que neutralizam a reação e dificultam a formação de espécies reativas (BABCOCK, 1999; HALLIWELL, 2006; NELSON; COX, 2014)

A formação de EROs é favorecida quando as mitocôndrias estão produzindo pouco ATP, seja por carência de ADP ou de O_2, nesta situação a proporção QH_2/Q é aumentada, e este aumento de QH_2 facilita a formação de Q^{-} e liberação de elétron para o O_2 (NELSON; COX, 2014).

Outro agravante para produção de espécies reativas é quando há um aumento significativo na quantidade de NADH que adentra à cadeia de transporte de elétrons. Nesta situação a mitocôndria se encontra em estresse oxidativo, havendo uma liberação excessiva de elétrons, o que resulta em maior aporte destes à cadeia do a quantidade que pode imediatamente atravessar até o O_2 para a formação de H_2O, facilitando o escape destes elétrons dentro do sistema (KUSHNAREVA et al., 2002; STARKOV; FISKUM, 2003; KUSSMAUL; HIRST, 2006).

2.6. PRINCIPAIS EROs

As EROs são formadas pela incorporação de um elétron livre à estrutura molecular dos O_2, formando radicais altamente reativos. As principais espécies conhecidas são o O_2^-, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($OH^\bullet$) (LENZI et al., 2000; MAIA; BICUDO, 2009; VENDITTI et al., 2013).

2.6.1. RADICAL SUPERÓXIDO (O_2^-)

O O_2^- é um radical livre formado a partir da reação entre um elétron livre e uma molécula de O_2, este é gerado principalmente durante a cadeia respiratória mitocondrial, e é o precursor da maioria das EROs (RAHA; ROBINSON, 2000; TURRENS, 2003; VENDITTI et al., 2013) (Figura 14).

FIGURA 14. Formação do radical superóxido (O_2^-) a partir da incorporação de um elétron livre ao oxigênio (O_2). (Autoria própria)

A maior parte do O_2^- é produzido dentro da matriz mitocondrial, este radical livre é incapaz de atravessar as membranas lipídicas e tem meia-vida, curta sendo rapidamente convertido, por ação enzimática, à H_2O_2 (LENAZ, 2001; MAIA; BICUDO, 2009; NOGUEIRA et al., 2013).

2.6.2. PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H_2O_2)

O O_2^- forma H_2O_2 ao receber um elétron, doado por outra molécula de O_2^- e dois H^+, esta reação pode ser espontânea ou catalisada por ação da enzima superóxido dismutase (SOD), presente em quantidades elevadas nas células dos mamíferos. (RAHA; ROBINSON, 2000; TURRENS, 2003; LAMBERT; BRAND, 2004b; VENDITTI et al., 2013) (Figura 15).

FIGURA 15. Esquematização da formação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), através da ação da superóxido dismutase (SOD). (Autoria própria)

O H_2O_2 formado por dismutação do O_2^-, por possuir estabilidade em sua estrutura, não é considerado propriamente um radical livre, entretanto é precursor na formação de uma potente EROs, o $OH^\bullet$ (GRIVEAU; LE LANNOU, 1997; TURRENS, 2003; FORD, 2004; BARREIROS et al., 2006).

2.6.3. RADICAL HIDROXIL ($OH^\bullet$)

O $OH^\bullet$ é considerado um dos mais potentes agentes oxidantes, sendo capaz de atravessar membranas e reagir com moléculas tais como lipídeos insaturados das membranas e DNA. Este é formado a partir do H_2O_2 e sua estrutura é composta por um átomo de hidrogênio ligado a um átomo de oxigênio, onde um dos elétrons do O_2 encontra-se desemparelhado (PRYOR et al., 1986; PASTOR et al., 2000; TURRENS, 2003).

Sua formação ocorre a partir da recepção de um elétron por parte do H_2O_2, podendo ser por reações envolvendo H_2O_2 e o íon férrico (Fe^{2+}) ou cobre (Cu^+), conhecida por reação de Fenton (GRIVEAU; LE LANNOU, 1997; LIOCHEV; FRIDOVICH, 1999; RAHA; ROBINSON, 2000; FORD, 2004; VENDITTI et al., 2013) (Figura 16), ou através de reação entre uma molécula de H_2O_2 e o O_2^-, conhecida como reação de Haber-Weiss (AITKEN et al., 1989; GRIVEAU; LE LANNOU, 1997; FORD, 2004) (Figura 17).

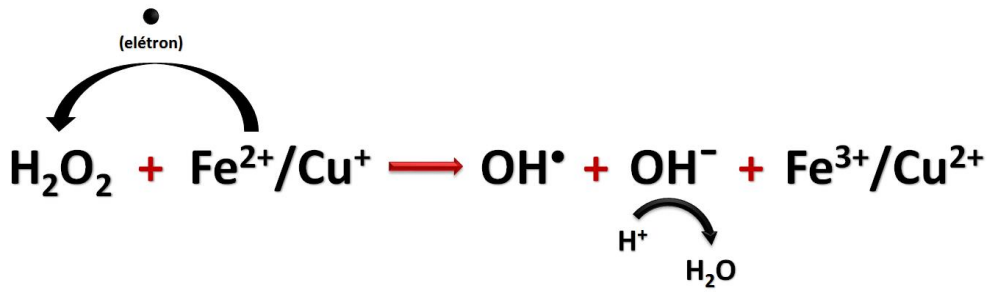

FIGURA 16. Formação do radical hidroxil ($OH^\bullet$) através da reação de Fenton. (Autoria própria)

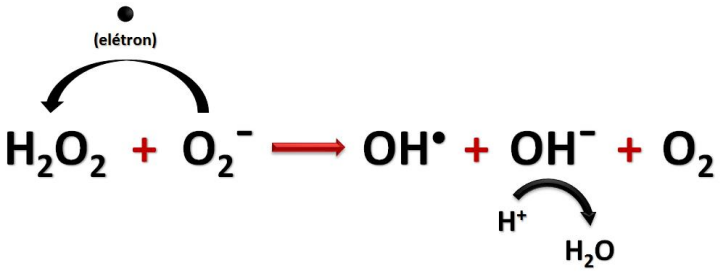

FIGURA 17. Formação do radical hidroxil ($OH^{\bullet}$) através da reação de Haber-Weiss. (Autoria própria)

2.7. AÇÃO DAS EROs NO ORGANISMO

Embora uma produção excessiva de EROs seja prejudicial às células, baixos níveis destes radicais são usados pelas células como sinalizadores que refletem suprimento insuficiente de O_2, induzindo ajustes metabólicos no organismo.

A atividade moderada das EROs é essencial para a ocorrência de certos eventos fisiológicos nas células espermáticas, tendo importância na maturação, capacitação, ligação à zona pelúcida e fertilização (DE LAMIRANDE; GAGNON, 1993; LENZI et al., 2002; FORD, 2004).

Acredita-se que níveis controlados de agentes oxidantes induzem aumento na motilidade espermática, ajudando na capacitação, resultando maior capacidade de ligação ao oócito (LECLERC et al., 1997; AITKEN et al., 1998; LECLERC et al., 1998).

De acordo com Ford (2004), a capacitação pode ser acelerada pelo incremento das concentrações de EROs, assim como o processo de capacitação pode ser retardado quando os agentes oxidantes são amplamente removidos.

O O_2^- e o H_2O_2, em baixas concentrações, são responsáveis por ativar proteínas quinases específicas. Estas enzimas têm a função de catalisar a transferência de grupos fosfatos provenientes de moléculas como o ATP, em direção à tirosina, promovendo fosforilação desta proteína (AITKEN et al., 1995; LECLERC et al., 1997; O'FLAHERTY et al., 2006).

Dentre os eventos relacionados à capacitação, o aumento da fosforilação da tirosina é o mais marcante, implicando em modificação na estrutura da proteína e alteração na simetria da membrana, transformações que levam à

capacitação, hiperativação e reação acrossomal, condições necessárias para que o espermatozoide penetre a zona pelúcida (DE LAMIRANDE; GAGNON, 1993; AITKEN et al., 1995; LECLERC et al., 1997; VISCONTI; KOPF, 1998; GADELLA et al., 2001; NAZ; RAJESH, 2004).

Com isto, Aitken et al., (1989), constataram que níveis equilibrados de EROs, são capazes de promover uma desestruturação fisiológica da membrana espermática, levando à adesão do espermatozoide à zona pelúcida do oócito.

Cohen et al., (1998) observaram in vitro, que o aumento nos níveis de H_2O_2 induziram aumento nos níveis de cálcio intracelular em espermatozoides de ratos indicando maior capacidade de fertilizar.

Entretanto, a concentração excessiva de EROs resulta em danos às células espermáticas, sendo capazes de reagir com enzimas, lipídeos de membrana e ácidos nucleicos, danificando-os (ALVAREZ; STOREY, 1993; LENAZ, 1998; BAUMBER et al., 2003; MAIA; BICUDO, 2009; RAJENDER et al., 2010).

É sugerido que a elevação exacerbada destes radicais favorece o aumento desordenado na permeabilidade da membrana externa da mitocôndria, pela abertura de poros transitórios, permitindo a entrada de sinalizadores que vão induzir as células à apoptose (LIU et al., 1996; LI et al., 1997; GANDINI et al., 2000; TURRENS, 2003; FORD, 2004).

Os altos níveis de $OH^{\bullet}$ circulantes promovem também desestruturação de enzimas importantes, como a succinato desidrogenase e enzimas do complexo I, comprometendo o funcionamento normal do ciclo do ácido cítrico, levando a inativação do transporte de elétrons e deficiência na produção de ATP, o que reflete em redução na motilidade espermática (DE LAMIRANDE; GAGNON, 1992; LI et al., 1995; RAHA; ROBINSON, 2000).

Dentre as consequências deletérias resultantes do desequilíbrio nos níveis de agentes oxidantes no organismo, o dano aos lipídeos de membrana levando ao processo de peroxidação lipídica é um dos mais significativos (GRIVEAU; LE LANNOU, 1997).

2.8. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

As células espermáticas dos mamíferos contêm em sua membrana uma concentração elevada de ácidos graxos polinsaturados, embora a presença de elevadas concentrações destes ácidos graxos garanta maior fluidez e flexibilidade à membrana do espermatozoide, também a torna mais susceptível à ação deletéria das EROs, que são capazes de desencadear uma sequência de reações resultando, por vezes, em lesão irreversível à membrana (LENZI et al., 1996; GRIVEAU; LE LANNOU, 1997; LENZI et al., 2002; GODWIN; PRABHU, 2006; SALMANI et al., 2013).

Nos garanhões a relação de ácidos graxos insaturados para ácidos graxos saturados é de nove para um, essa proporção implica em aumento nas chances de ocorrência do processo conhecido como peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (CHOW et al., 1986; VARNER; JOHNSON, 2007).

A peroxidação lipídica é determinada por uma sequência de reações desencadeada a partir da ação do $OH^{\bullet}$, que sequestra um H^{+} dos ácidos graxos polinsaturados presentes na bicamada fosfolipídica das membranas, se convertendo a H_2O. Esse processo promove uma desestabilização do ácido graxo formando uma região reativa, com um elétron livre, o radical alquil ($R^{\bullet}$). Esta região de instabilidade acaba reagindo com uma molécula de O_2 circulante formando os radicais alcoxil ($RO^{\bullet}$) ou peroxil ($ROO^{\bullet}$), que têm a tendência de buscar estabilidade retirando uma molécula de H^{+} e um elétron presentes nos fosfolipídeos adjacentes, levando a formação do hidroperóxido lipídico (ROOH). A remoção deste H^{+} do ácido graxo vizinho, induz a formação de um novo $R^{\bullet}$, desencadeando uma reação em cadeia. (GARDNER, 1989; GRIVEAU; LE LANNOU, 1997; HALLIWELL, 2006) (Figura 18).

Se a reação em cadeia não for interrompida haverá a formação de ligações entre os radicais instáveis ($R^{\bullet}$-$R^{\bullet}$, $R^{\bullet}$-$ROO^{\bullet}$ ou $ROO^{\bullet}$-$ROO^{\bullet}$), que afetam a fluidez, elasticidade e permeabilidade da membrana, fragilizando-a e levando à quebra da estrutura (GARDNER, 1989; CATALA, 2006). Levando à diminuição da motilidade e viabilidade espermáticas (STOREY, 1997).

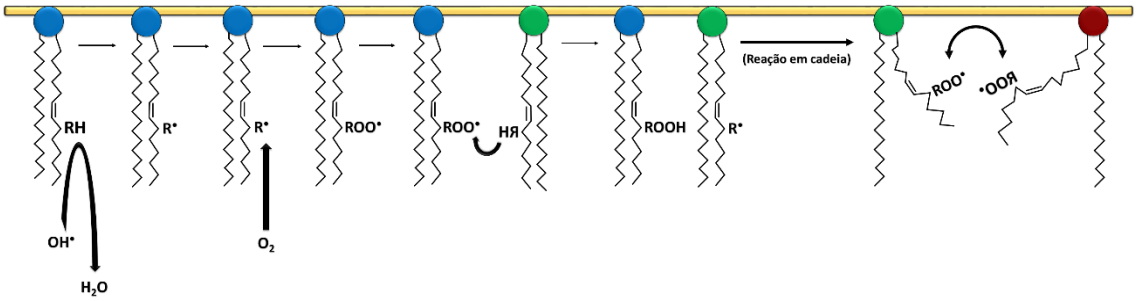

FIGURA 18. Esquematização da reação em cadeia ocorrida na membrana plasmática durante a peroxidação lipídica. H_2O (água); $OH^{\bullet}$ (radical hidroxil); RH (região estável no ácido graxo); $R^{\bullet}$ (radical alquil); $ROO^{\bullet}$ (radical peroxil); ROOH (hidroperóxido lipídico). (Autoria própria)

De acordo com Walliwell (2006), os íons de ferro e cobre, são capazes de reagir com o ROOH, doando ou sequestrando elétrons, desestabilizando a molécula e reiniciando a reação em cadeia (Figura 19).

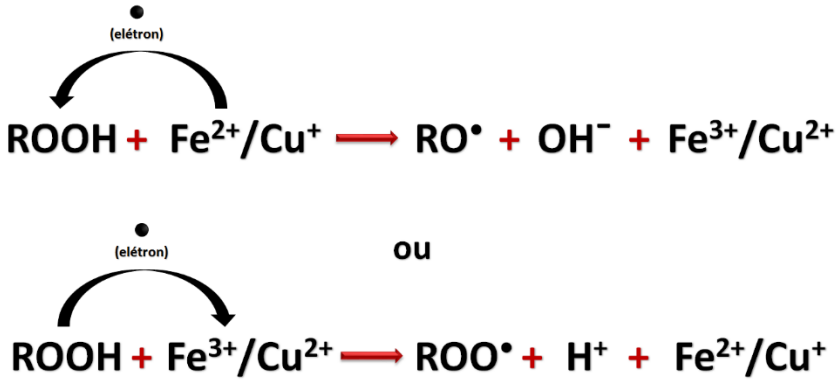

FIGURA 19. Desestabilização do hidroperóxido lipídico (ROOH) por ação dos íons metálicos (Fe^{2+}/Cu^{+} ou Fe^{3+}/Cu^{2+}). (Autoria própria)

2.9. CRIOINJÚRIAS E EROs

O processo de criopreservação promove injúrias às células espermáticas, incluindo perda de motilidade, alterações funcionais e estruturais, podendo ter sua capacidade de fertilizar comprometida (O'CONNELL et al., 2002; MAIA; BICUDO, 2009).

O estresse térmico causado durante a preservação pelo frio pode resultar em dano à mitocôndria, levando ao comprometimento do metabolismo energético dos espermatozoides e aumento na produção de EROs, sendo

relacionado com a queda na motilidade espermática (RUIZ-PESINI et al., 1998; SCHOBER et al., 2007).

Durante o processo de refrigeração e congelação é observado um aumento no dano ao DNA (BETANCUR et al., 2012). Em estudo com sêmen equino criopreservado, Baumber et al., (2003) observaram que o aumento na quantidade de EROs após o processo de congelação resultou em maior fragmentação de DNA das células espermáticas.

Um dos principais danos causados pela criopreservação é a peroxidação lipídica, resulta na perda de motilidade decorrente do aumento da permeabilidade da membrana, sendo indicado como um importante causador de danos subletais às células espermáticas nos equinos (ALVAREZ; STOREY, 1992; ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2009). Observou-se que quando há o aumento da produção de peróxidos lipídicos ($R^{\bullet}$ ou $ROO^{\bullet}$) ocorre uma queda na motilidade espermática, reduzindo a capacidade da fertilização (LENZI et al., 2000; BETANCUR et al., 2012).

Os agentes antioxidantes são importantes na redução dos danos causados pelas EROs produzidas durante o processo de criopreservação, entretanto a maior parte dos antioxidantes endógenos se encontram no meio intracelular, e durante o período de maturação, o espermatozoide perde grande parte do seu citoplasma e junto com ele uma quantidade relevante de antioxidantes (CARVALHO et al., 2002),

Diante disto, o plasma seminal assume um papel importante, sendo fonte de antioxidantes para as células espermáticas (AGARWAL; SALEH, 2002; SIKKA, 2004). Porém, durante a congelação espermática, é realizada a retirada do plasma seminal, e junto com este, são removidas substâncias antioxidantes responsáveis por reduzir a concentração das EROs e proteger a membrana plasmática da peroxidação lipídica (LENZI et al., 2000; SAFARINEJAD et al., 2010).

Thuwanut et al., (2008), observaram que ao se adicionar substâncias antioxidantes durante a congelação de sêmen do epidídimo de felinos, foi visibilizado melhora nos parâmetros de cinética, integridade de membrana e integridade de DNA. Reafirmando a importância da ação de agentes antioxidantes durante a criopreservação.

2.10. PRINCIPAIS ANTIOXIDANTES E SUAS FUNÇÕES

Nas mitocôndrias que realizam metabolismo oxidativo ativamente, de 0,1 a 4% do O_2 utilizado na respiração chega a formar O_2^-, quantidade mais que suficiente para induzir efeitos deletérios às células, necessitando que estes radicais sejam rapidamente neutralizados por agentes antioxidantes (NELSON; COX, 2014).

Para tal, as células espermáticas possuem compostos com função de combater o excesso de EROs e manter a homeostase celular, além disto são amplamente adicionadas aos meios diluidores de sêmen, substâncias naturais e sintéticas com funções antioxidantes (LENZI et al., 2000).

Os antioxidantes nas células espermáticas agem basicamente de duas maneiras, eles podem impedir a produção dos EROs ou interromper a reação em cadeia que ocorre durante peroxidação lipídica (SILVA; GUERRA, 2012). Podendo ser definidos como enzimáticos, quando sua função antioxidante é desempenhada por enzimas, e não enzimáticos (ANDREYEV et al., 2005).

2.10.1. ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

Para impedir o dano oxidativo induzido pelas EROs, as células possuem um sistema de defesa primário realizado por enzimas, fazendo parte deste grupo a SOD, que em ação conjunta com a glutationa-peroxidase (GPx) e catalase (CAT), realizam conversão do O_2^- à H_2O (FINKEL; HOLBROOK, 2000; LENAZ, 2001; LOPEZ-FERNANDEZ et al., 2007; LA FALCI et al., 2011; NOGUEIRA et al., 2013).

A SOD é um antioxidante enzimático encontrado na matriz mitocondrial, no citosol e no plasma seminal, tem a função de converter duas moléculas de O_2^- em H_2O_2 e O_2, através de reação de dismutação (FRIDOVICH, 1995; RAHA; ROBINSON, 2000; LAMBERT; BRAND, 2004b) (Figura 15). Foi observado por Stefanov et al. (2004), que a administração exógena de SOD ao ejaculado ovino promoveu queda acentuada nos níveis de O_2^- encontrados.

Outra enzima amplamente encontrada nas células é a GPx, estando presente na matriz mitocondrial, espaço intermembranas e citosol, realizando sua função antioxidante ao retirar H^+ e elétrons de duas moléculas de glutationa reduzida (GSH) doando-os ao H_2O_2, resultando em duas moléculas de H_2O e uma de glutationa oxidada (GSSG) (PRYOR et al., 1986; TURRENS, 2003; VENDITTI et al., 2013) (Figura 20).

FIGURA 20. Ação da glutationa-peroxidase (GPx) na remoção do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), convertendo glutationa reduzida (GSH) em glutationa oxidada (GSSG). (Autoria própria)

A CAT também é responsável por decompor as moléculas de H_2O_2, convertendo-os a H_2O e O_2. Esta normalmente localiza-se nos peroxissomos, que são organelas presentes no citosol das células dos organismos eucariontes, mas também é encontrada nas mitocôndrias das células do coração dos mamíferos (PANFILI et al., 1991; RADI et al., 1991; PHUNG et al., 1994; ANDREYEV et al., 2005; SILVA; GUERRA, 2011) (Figura 21).

FIGURA 21. Conversão de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) à água (H_2O) e oxigênio (O_2) por ação da catalase (CAT). (Autoria própria)

Em estudo conduzido na espécie humana, Safarinejad et al., (2010) determinaram que a atividade insatisfatória das enzimas GPx e CAT no plasma seminal esteve diretamente relacionada com a queda na fertilidade dos pacientes.

Em alguns casos, a linha primária de defesa contra as EROs, representada pelos antioxidantes enzimáticos, é insuficiente para promover redução satisfatória dos agentes oxidantes e homeostase celular aos espermatozoides, sendo necessário lançar mão da inclusão de antioxidantes não enzimáticos

naturais ou sintéticos aos meios diluidores de sêmen (KANKOFER et al., 2005; SHARAFI et al., 2015).

2.10.2. ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICOS

Os antioxidantes não enzimáticos são substâncias de baixo peso molecular que atuam como removedores dos agentes causadores dos danos oxidativos ou como reparadores de lesões já iniciadas. Estes podem ser de origem natural, geralmente provenientes de vegetais, ou de origem sintética (ANDRADE et al., 2010; RANAWAT et al., 2013).

Dentre os antioxidantes não enzimáticos envolvidos na reprodução, destacam-se o α-tocoferol (vitamina E), o ácido ascórbico (vitamina C) e os compostos fenólicos, dentre eles os flavonoides (FINKEL; HOLBROOK, 2000; LENZI et al., 2002; ANDRADE et al., 2010).

A vitamina E é um poderoso antioxidante, lipossolúvel, presente na membrana interna das mitocôndrias, com a função de doar elétrons e H^+ ao $ROO^{\bullet}$, interrompendo a reação em cadeia durante a peroxidação lipídica (HAM; LIEBLER, 1995; BARREIROS et al., 2006). Segundo Chow et al., (1999), redução nos níveis de vitamina E no organismo estão relacionados com elevadas concentrações de O_2^-, sugerindo atividade deste antioxidante sobre a remoção do radical.

Outro importante antioxidante não enzimático é a vitamina C, esta funciona como agente redutor, doando elétrons e H^+ às EROs, convertendo-as em espécies inofensivas. Devido ao seu caráter hidrossolúvel, é incapaz de debelar diretamente a peroxidação lipídica, agindo em associação com a vitamina E para executar tal função (BIANCHI; ANTUNES, 1999; WRIGHT et al., 2001). Entretanto, a vitamina C também é capaz de doar elétrons aos íons metálicos Fe^{3+} e Cu^{2+}, tornando-os compostos metálicos reduzidos, que vão participar da reação de Fenton, convertendo H_2O_2 à $OH^{\bullet}$ e imprimindo danos às biomoléculas (BIANCHI; ANTUNES, 1999; MCNIVEN; RICHARDSON, 2003; BARREIROS et al., 2006).

Entre os antioxidantes não enzimáticos, os compostos fenólicos têm significativa importância. Estes são caracterizados por possuir em sua estrutura um ou mais anéis aromáticos ligados a grupamentos hidroxila (OH). Neste grupo

de compostos destacam-se os flavonoides, que são considerados antioxidantes mais eficientes do que as vitaminas E e C (STOJANOVIC et al., 2001).

O seu potencial antioxidante está diretamente ligado à quantidade de OH presentes em sua estrutura. Quanto mais grupamentos OH um flavonoide possui maior sua capacidade de doar elétrons e H^+ (CAO et al., 1997; BARREIROS et al., 2006; ALRAWAIQ; ABDULLAH, 2014). Os flavonoides monoidroxilados possuem baixa capacidade antioxidante, já os flavonoides com múltiplas OH, como é o caso da quercetina, são considerados eficientes inativadores de EROs (CAO et al., 1997; YANG et al., 2001; BARREIROS et al., 2006).

Além da capacidade de reduzir o excesso de agentes oxidantes através da doação de H^+ e elétrons, os antioxidantes flavonoides são capazes de reagir com compostos metálicos como o Fe^{2+}, impedindo que este participe da reação de Fenton, resultando em menor produção de $OH^{\bullet}$ (AFANAS'EV et al., 1989).

2.11. QUERCETINA

A quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona) é um antioxidante natural não enzimático, do grupo dos flavonoides, amplamente encontrado nas frutas, legumes, sementes, nozes e vinho tinto (NOGUEIRA et al., 2013; RANAWAT et al., 2013; ALRAWAIQ; ABDULLAH, 2014). Esta substância tem se mostrado eficiente no tratamento de diversas patologias, apresentando atividade hepatoprotetora, anticoagulante, antinflamatória e antiviral. Aparentemente sua eficácia está ligada à capacidade de remoção de agentes oxidantes (HAVSTEEN, 1983; GRYGLEWSKI et al., 1987; SAIJA et al., 1995).

Seu arranjo molecular é caracterizado como um polifenol flavonoide, possuindo cinco grupamentos OH em sua estrutura (HUSAIN et al., 1987; ALRAWAIQ; ABDULLAH, 2014) (Figura 22).

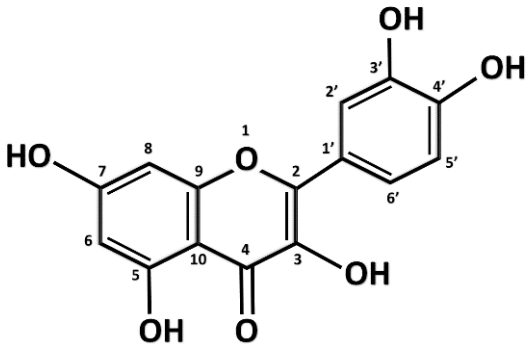

FIGURA 22. Estrutura molecular da quercetina (3,3',4',5,7- pentahidroxiflavona). (Autoria própria)

Em virtude da grande quantidade de OH encontradas em sua estrutura, possui eficiente capacidade antioxidante, possibilitando a doação de até cinco elétrons e H^+ às EROs, estabilizando-as (HUSAIN et al., 1987; SILVA; GUERRA, 2012).

A quercetina pode promover sua ação antioxidante de três maneiras, reagindo com os radicais O_2^- e $OH^\bullet$, agindo como quelante de íons metálicos ou interrompendo a continuidade da peroxidação lipídica (AFANAS'EV et al., 1989).

De acordo com Chen et al., (1990), este flavonoide é capaz de reduzir consideravelmente as concentrações de O_2^-, além de possuir a capacidade de reagir diretamente com o $OH^\bullet$, doando elétrons e H^+ para este radical resultando na formação de H_2O. Ao fim deste processo, o antioxidante é convertido em um radical livre pouco reativo (HUSAIN et al., 1987; CHEN et al., 1990; WRIGHT et al., 2001) (Figura 23).

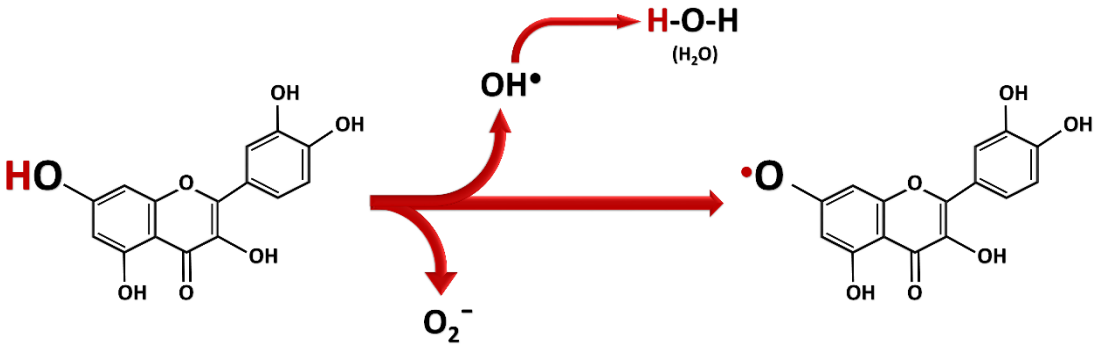

FIGURA 23. Ação da quercetina estabilizando os radicais superóxido (O_2^-) ou radical hidroxil ($OH^\bullet$). (Autoria própria)

Este antioxidante também tem a capacidade de atuar como quelante de íons metálicos, reagindo e impedindo que o íon Fe^{2+} doe elétrons para o H_2O_2

interrompendo a reação de Fenton e formação do OH• (AHERNE; O'BRIEN, 2000; GÜLÇIN, 2012). Além de minimizar também a participação deste íon metálico no desencadeamento da peroxidação lipídica (HALLIWELL, 2006) (Figura 24).

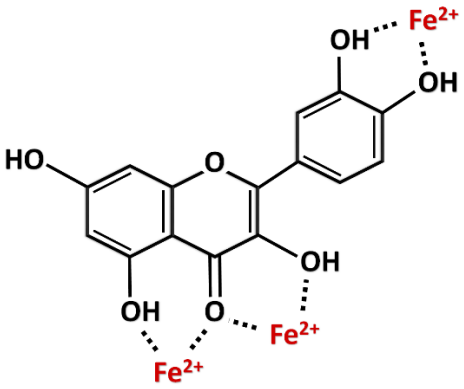

FIGURA 24. Esquematização da função da quercetina como quelante do íon férrico (Fe^{2+}). (Autoria própria)

Outra possibilidade de ação antioxidante executada pela quercetina durante a peroxidação lipídica ocorre em decorrência deste flavonoide possuir caráter lipofílico, sendo capaz de interagir com a bicamada lipídica e permitindo a doação direta de H^+ e elétrons a radicais como o ROO•, estabilizando e convertendo-os a ROOH, impedindo assim a continuidade da reação em cadeia (AFANAS'EV et al., 1989; SAIJA et al., 1995; BARREIROS et al., 2006) (Figura 25).

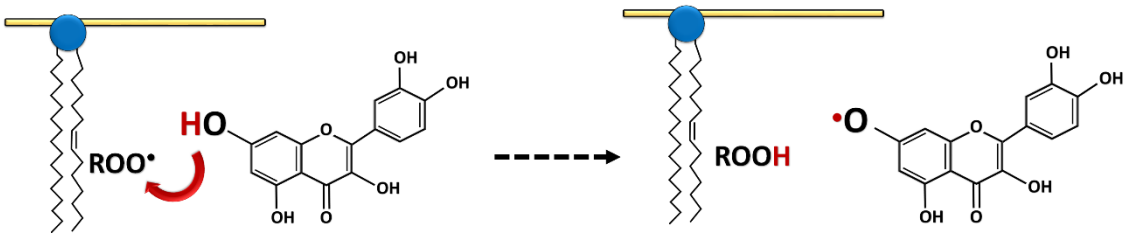

FIGURA 25. Bloqueio à reação em cadeia durante a peroxidação lipídica por ação da quercetina, ao doar um elétron e um próton (H^+) ao radical peroxil (ROO•) formando hidroperóxido lipídico (ROOH). (Autoria própria)

Embora a eficiência da quercetina como antioxidante já esteja bem estabelecida, os relatos sobre a incorporação do antioxidante às biotecnologias

de manipulação do sêmen apresentam resultados variados e, por vezes, contraditórios (RANAWAT et al., 2013).

Em humanos, a adição de 50 µM deste antioxidante ao sêmen congelado apresentou aumento na motilidade, viabilidade espermáticas e redução na fragmentação de DNA quando comparado ao grupo não tratado (ZRIBI et al., 2013). Resposta não encontrada por Khanduja et al., (2001), que avaliando o sêmen fresco na mesma espécie, observaram queda na motilidade total quando adicionado quercetina ao meio, além de manter os níveis de peroxidação lipídica semelhantes aos do grupo controle.

Em estudo com sêmen congelado de ovinos Silva et al., (2012), não encontraram incremento na cinética espermática e integridade de membranas ao se adicionar diferentes concentrações de quercetina ao meio.

A utilização deste antioxidante no sêmen refrigerado de coelhos induziu menor dano à membrana plasmática e acrossomal, assim como menores índices de peroxidação lipídica. Em contrapartida não houve redução na fragmentação de DNA e se detectou menor motilidade total em comparação ao grupo não tratado (JOHINKE et al., 2014).

Já a adição de 0,1 mM de quercetina ao meio de refrigeração para sêmen de equinos mantido à 5°C por até 144 horas resultou em maior preservação da motilidade espermática total, maior integridade de membrana, maiores níveis intracelulares de ATP e menor peroxidação lipídica (MCNIVEN; RICHARDSON, 2003).

Gibb et al., (2013), utilizaram a quercetina no sêmen criopreservado e sexado de equinos, e embora nos espermatozoides não sexados na presença do antioxidante, tenha sido observada redução nos níveis de fragmentação de DNA e aumento da motilidade total, não se obteve resultados expressivos para as células sexadas.

As características inerentes à quercetina, como a capacidade de doar elétrons e H^+, aptidão para atuar como quelante de íons metálicos e potencial para interromper a peroxidação lipídica, a classificam como um potente antioxidante. Entretanto a sua aplicação com eficiência sobre o ejaculado dos mamíferos, em especial dos equinos, ainda é controversa em virtude da variedade de resultados encontrados na literatura, que muitas vezes são

conflitantes, tornando necessário a realização de novas investigações acerca do assunto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFANAS'EV, I.B.; DOROZHKO, A.I.; BRODSKII, A.V.; KOSTYUK, V.A.; POTAPOVITCH, A.I. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, v.38, p.1763-1769, 1989.

AGARWAL, A.; SALEH, R.A. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. **Urologic Clinics of North America**, v.29, p.817-827, 2002.

AHERNE, S.A.; O'BRIEN N.M. Mechanism of protection by the flavonoids, quercetin and rutin, against tert-butylhydroperoxide- and menadioneinduced DNA single strand breaksin Caco-2 cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v.29, p.507-514, 2000.

AITKEN, R.J.; CLARKSON, J.S.; FISEL, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. **Biology of Reproduction**, v.40, p.183-197, 1989.

AITKEN, R.J.; HARKISS, D.; KNOX, W.; PATERSON, M.; IRVINE, D.S. A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterised by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation. **Journal of Cell Science**, v.111, p.645-656, 1998.

AITKEN, R.J.; PATERSON, M.; FISHER, H.; BUCKINGHAM, D.W.; VAN DUIN, M. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. **Journal of Cell Science**, v.108, p.2017-2025, 1995.

ALRAWAIQ, N.S.; ABDULLAH, A. A review of flavonoid quercetin: metabolism, bioactivity and antioxidant properties. **International Journal of PharmTech Research**, v.6, p.933-941, 2014.

ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. **Journal of Andrology**, v.13, p.232-241, 1992.

ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. 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**, v.14, p.199-209, 1993.

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, p.79-85, 2010.

ANDREYEV, A.Y.; KUSHNAREVA, Y.E.; STARKOV, A.A. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. **Biochemistry**, v.70, p.200-214, 2005.

BABCOCK, G.T. How oxygen is activated and reduced in respiration. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.96, p.12971-12973, 1999.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, p.113-123, 2006.

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

BETANCUR, G.R.; LÓPEZ, E.P.; ROJANO, B.A. Estrés oxidativo en el semen equino criopreservado. **Revista Lasallista de Investigación**, v.9, p.128-136, 2012.

BERTRAM, R.; GRAM P.M.; LUCIANI D.S.; SHERMAN A. A simplified model for mitochondrial ATP production. **Journal of Theoretical Biology**, v.243, p.575-586, 2006.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v.12, p.123-130, 1999.

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

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R.L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biology and Medicine**, v.22, p.749-760, 1997.

CAPALDI, R.A. Arrangement of proteins in the mitochondrial inner membrane. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.694, p.292-306, 1982.

CARVALHO, O.F.; FERREIRA, J.D.J.; SILVEIRA, N.A.; FRENEAU, G.E. Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.38, p.33-38, 2002.

CATALA, A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.38, p.1482-1495, 2006.

CHEN, Y.; ZHENG, R.; JIA, Z.; JU, Y. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. **Free Radical Biology and Medicine**, v.9, p.19-21, 1990.

CHOW, C.K.; IBRAHIM, W.; WEI, Z.; CHAN, A.C. Vitamin E regulates mitochondrial hydrogen peroxide generation. **Free Radical Biology and Medicine**, v.27, p.580-587, 1999.

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.

COHEN, N.; LUBART, R.; RUBINSTEIN, S.; BREITBART, H. Light irradiation of mouse spermatozoa: stimulation of in vitro fertilization and calcium signals**. Photochemistry and Photobiology**, v.68, p.407-413, 1998.

CROFTS, A.R.; LHEE, S.; CROFTS, S.B.; CHENG, J.; ROSE, S. Proton pumping in the bc1 complex: a new gating mechanism that prevents short circuits. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1757, p.1019-1034, 2006.

DOWSETT, K.F.; OSBORNE, H.G.; PATTIE, W.A. Morphological characteristics of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.22, p463-472, 1984.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. **Free Radical Biology and Medicine**, v.14, p.157-166, 1993.

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

FINKEL, T.; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v.408, p.239-247, 2000.

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

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

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual Review of Biochemistry**, v.64, p.97-112, 1995.

GADELLA, B.M.; RATHI, R.; BROUWERS, J.F.; STOUT, T.A.; 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, p.830-839, 2000.

GARCÍA, B.M.; FERNÁNDEZ, L.G.; FERRUSOLA, C.O.; RODRÍGUEZ, A.M.; BOLAÑOS, J.M.G.; MARTINEZ, H.R.; TAPIA, J.A.; MORCUENDE, D.; PEÑA, F.J. Fatty acids and plasmalogens of the phospholipids of the sperm membranes and their relation with the post-thaw quality of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 75, p. 811-818, 2011.

GARDNER, H.W. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v.7, p.65-86, 1989.

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

GODWIN, A.; PRABHU, H.R. Lipid peroxidation of fish oils. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v.21, p.202-204, 2006.

GRIVEAU, J.F.; LE LANNOU, D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. **International Journal of Andrology**, v.20, p.61-69, 1997.

GRYGLEWSKI, R.J.; KORBUT, R.; ROBAK, J.; SWIES, J. On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. **Biochemical Pharmacology**, v.36, p.317-322, 1987.

GÜLÇIN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Archives of Toxicology**, v.86, p.345-391, 2012.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration. Where are we now? **Journal of Neurochemistry**, v. 97, p. 1634-1658, 2006.

HAM, A.J.; LIEBLER, D.C. Vitamin E oxidation in rat liver mitochondria. **Biochemistry**, v.34, p.5754-5761, 1995.

HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochemical Pharmacology**, v.32, p.1141-1148, 1983.

HERRERO, A.; BARJA, G. Localization of the site of oxygen radical generation inside the complex I of heart and nonsynaptic brain mammalian mitochondria. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v.32, p.609-615, 2000.

HUSAIN, S.R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochemistry**, v.26, p.2489-2491, 1987.

JOHINKE, D.; DE GRAAF, SP.; BATHGATE, R. Quercetin reduces the in vitro production of H2O2 during chilled storage of rabbit spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.151, p.208-219, 2014.

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

KHANDUJA, K.L.; VERMA, A.; BHARDWAJ, A. Impairment of human sperm motility and viability by quercetin is independent of lipid peroxidation. **Andrologia**, v.33, p.277-281, 2001.

KOZLOV, A.V.; GILLE, L.; STANIEK, K.; NOHL, H. Dihydrolipoic acid maintains ubiquinone in the antioxidant active form by two-electron reduction of ubiquinone and one-electron reduction of ubisemiquinone. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.363, p.148-154, 1999.

KRESGE, N.; SIMONI, R.D.; HILL, R.L. Otto Fritz Meyerhof and the elucidation of the glycolytic pathway. **The Journal of Biological Chemistry**, v.280, p124-126, 2005.

KUSHNAREVA, Y.; MURPHY, A.N.; ANDREYEV, A. Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)+ oxidation-reduction state. **Biochemical Journal**, v.368, p.545-553, 2002.

KUSSMAUL, L.; HIRST, J. The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.103, p.7607-7612, 2006.

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

LAMBERT, A.J.; BRAND, M.D. Inhibitors of the quinone-binding site allow rapid superoxide production from mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). **The Journal of Biological Chemistry**, v.279, p.39414-39420, 2004a.

LAMBERT, A.J.; BRAND, M.D. Superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane. **Biochemical Journal**, v.382, p.511-517, 2004b.

LECLERC, P.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Interaction between Ca^{2+}, cyclic 3‘,5’ adenosine monophosphate, the superoxide anion, and tyrosine phosphorylation pathways in the regulation of human sperm capacitation. **Journal of Andrology**, v.19, p.434-443, 1998.

LECLERC, P.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. **Free Radical Biology and Medicine**, v.22, p.643-656, 1997.

LENAZ, G. Role of mitochondria in oxidative stress and ageing. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1366, p.53-67, 1998.

LENAZ, G. The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life**, v.52, p.159-164, 2001.

LENAZ, G.; FATO, R.; FORMIGGINI, G.; GENOVA, M.L. The role of Coenzyme Q in mitochondrial electron transport. **Mitochondrion**, v.7, p.S8-S33, 2007.

LENZI, A.; GANDINI, L.; LOMBARDO, F.; PICARDO, M.; MARESCA, V.; PANFILI, E.; TRAMER, F.; BOITANI, C.; DONDERO, F.; Polyunsaturated fatty acids of germ cell membranes, glutathione and blutathione-dependent enzyme-PHGPx: from basic to clinic. **Contraception**, v.65, p.301-304, 2002.

LENZI, A.; GANDINI, L.; PICARDO, M.; TRAMER, F.; SANDRI, G.; PANFILI, E. Lipoperoxidation damage of spermatozoa polyunsaturated fatty acids (PUFA): scavenger mechanisms and possible scavenger therapies. **Frontiers in Bioscience**, v.5, p.1-15, 2000.

LENZI, A.; PICARDO, M.; GANDINI, L.; DONDERO, F. Lipids of sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acid considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. **Human Reproduction Update**, v.2, p.246-256, 1996.

LI, Y.; HUANG, T.T.; CARLSON, E.J.; MELOV, S.; URSELL, P.C.; OLSON, J.L.; NOBLE, L.J.; YOSHIMURA, M.P.; BERGER, C.; CHAN, P.H.; WALLACE, D.C.; EPSTEIN, C.J. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. **Nature Genetics**, v. 11, p.376-381, 1995.

LI, P.; NIJHAWAN, D.; BUDIHARDJO, I.; SRINIVASULA, S.M.; AHMAD, M.; ALNEMRI, E.S.; WANG, X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. **Cell**, v.91, p.479-489, 1997.

LIOCHEV, S.I.; FRIDOVICH, I. Superoxide and iron: partners in crime. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life**, v.48, p.157-161, 1999.

LIU, Y.; FISKUM, G.; SCHUBERT, D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. **Journal of Neurochemistry**, v.80, p.780-787, 2002.

LIU, X.; KIM, C.N.; YANG, J.; JEMMERSON, R.; WANG, X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. **Cell**, v.86, p.147-157, 1996.

LOPEZ-FERNANDEZ, C.; CRESPO, F.; ARROYO, F.; FERNANDEZ, J.L.; ARANA, P.; JOHNSTON, S.D.; GOSALVEZ, J. Dynamics of sperm DNA fragmentation in domestic animals II. The stallion. **Theriogenology**, v.68, p.1240-1250, 2007.

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

MCNIVEN, M.A.; RICHARDSON, G.F. Chilled storage of stallion semen using perfluorochemicals and antioxidants. **Cell Preservation Technology**, v.1, p.165-174, 2003.

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.

NAGY, E.; HENICS, T.; ECKERT, M.; MISETA, A.; LIGHTOWLERS, R.N.; KELLERMAYER, M. Identification of the NAD (+)-binding fold of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a novel RNA-binding domain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.275, p.253-260, 2000.

NAVARRO, A.; BOVERIS, A. The mitochondrial energy transduction system and aging process. **American Journal of Physiology**, v.292, p.C670-C686, 2007.

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

NAZARET, C.; HEISKE, M.; THURLEY, K.; MAZAT, J.P. Mitochondrial energetic metabolism: a simplified model of TCA cycle with ATP production. **Journal of Theoretical Biology**, v.258, p.455-464, 2009.

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

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 Eletrónica Veterinária**, v.15, p. 1-15, 2013.

NOURI, H.; TOWHIDI, A.; ZHANDI, M.; SADEGHI, R. The effects of centrifuged egg yolk used with INRA plus soybean lecithin extender on semen quality to freeze miniature caspian horse semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.33, p.1050-1053, 2013.

O'CONNELL, M.; MCCLURE, N.; LEWIS, S.E.M. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. **Human Reproduction**, v.17, p.704-709, 2002.

O'FLAHERTY, C.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. **Free Radical Biology and Medicine**, v.41, p.528-540, 2006.

OLIVEIRA, G.C.; OLIVEIRA, B.M.M.; CALEGHINI, E.C.C.; FERNANDES, C.B.; MATTOS, C.B. Criopreservação do semen equino: uma revisão**. Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.37, p.23-28, 2013.

ORTEGA- FERRUSOLA, C.; GONZALEZ, F.L.; MORRELL J.M.; SALAZAR, S.C.; MACÍAS- GARCÍA, B.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; TAPIA, J.A.; PEÑA, F.J. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. **Reproduction**, v.138, p.55-63, 2009.

PANFILI, E.; SANDRI, G.; ERNSTER, L. Distribution of glutathione peroxidases and glutathione reductase in rat brain mitochondria. **FEBS Letters**, v.290, p.35-37, 1991.

PASTOR, N.; WEINSTEIN, H.; JAMISON, E.; BRENOWITZ, M. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBPDNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence specific binding. **Journal of Molecular Biology**, v.304, p.55-68, 2000.

PATEL, M.S.; KOROTCHKINA, L.G. Regulation of mammalian pyruvate dehydrogenase complex by phosphorylation: complexity of multiple phosphorylation sites and kinases. **Experimental and Molecular Medicine**, v.33, p.191-197, 2001.

PELICANO, H.; MARTIN, D.S.; XU, R.H.; HUANG, P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. **Oncogene**, v.25, p.4633-4646, 2006.

PESCH, S.; BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. **Micron**, v.37, p.597-612, 2006.

PRYDE, K.R.; HIRST, J. Superoxide is produced by the reduced flavin in mitochondrial complex I: a single, unified mechanism that applies during both forward and reverse electron transfer. **The Journal of Biological Chemistry**, v.286, p.18056-18065, 2011.

PRYOR, W.A. Oxy–radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. **Annual Review of Physiology**, v.48, p.657-667, 1986.

PHUNG, C.D.; EZIEME, J.A.; TURRENS, J.F. Hydrogen peroxide metabolism in skeletal muscle mitochondria. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.315, p.479-482, 1994.

QUINLAN, C.L.; ORR, A.L.; PEREVOSHCHIKOVA, I.V.; TREBERG, J.R.; ACKRELL, B.A.; BRAND, M.D. Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. **The Journal of Biological Chemistry**, v.287, p.27255-27264, 2012.

RADI, R.; TURRENS, J.F.; CHANG, L.Y.; BUSH, K.M.; CRAPO, J.D.; FREEMAN, B.A. Detection of catalase in rat heart mitochondria. **The Journal of Biological Chemistry**, v.266, p.22028-22034, 1991.

RAHA, S.; ROBINSON, B.H. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. **Trends in Biochemical Sciences**, v.25, p.502-508, 2000.

RAJENDER, S.; RAHUL, P.; MAHDI, A.A. Mitochondria, spermatogenesis and male infertility. **Mitochondrion**, v.10, p.419-428, 2010.

ROBERTSON, J.D. Membrane structure. **The Journal of Cell Biology**, v.91, p.189-204, 1981.

ROMANO, A.H.; CONWAY, T. Evolution of carbohydrate metabolic pathways. **Research in Microbiology**, v.147, p.448-455, 1996.

RANAWAT, P.; PATHAK, C.M.; KHANDUJA, K.L. A new perspective on the quercetin paradox in male reproductive dysfunction. **Phytotherapy Research**, v.27, p.802-810, 2013.

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.

RUIZ-PESINI, E.; DIEZ, C.; LAPEÑA, A.C.; PÉREZ-MARTOS, A.; MONTOYA, J.; ALVAREZ, E.; ARENAS, J.; LÓPEZ-PÉREZ, M.J. Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. **Clinical Chemistry**, v.44, p.1616-20, 1998.

SAFARINEJAD, M.R.; HOSSEINI, S.Y.; DADKHAH, F.; ASGARI, M.A. Relationship of omega-3 and omega-6 fatty acids with semen characteristics, and anti-oxidant status of seminal plasma: A comparison between fertile and infertile men. **Clinical Nutrition**, v.29, p.100-105, 2010.

SAIJA, A.; SCALESE, M.; LANZA, M.; MARZULLO, D.; BONINA, F.; CASTELLI, F.; Flavonoids as antioxidant agents: importance of their interaction with biomembranes. **Free Radical Biology and Medicine**, v.19, p.481-486, 1995.

SALMANI, H.; NABI, M.M.; VASEGHI-DODARAN, H.; RAHMAN, M.B.; MOHAMMADI-SANGCHESHMEH, A.; SHAKERI, M.; TOWHIDI, A.; SHAHNEH, A.Z.; ZHANDI, M. Effect of glutathione in soybean lecithin-based semen extender on goat semen quality after freeze-thawing. **Small Ruminant Research**, v.112, p.123-127, 2013.

SARASTE, M. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. **Science**, v.283, p.1488-1493, 1999.

SCHOBER, D.; AURICH, C.; NOHL, H.; GILLE, L. Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.68, p.745-754, 2007.

SHARAFI, M.; ZHANDI, M.; AKBARI SHARIF, A. Supplementation of soybean lecithin-based semen extender by antioxidants: complementary flowcytometric study on post-thawed ram spermatozoa. **Cell Tissue Bank**, v.16, p.261-269, 2015.

SIKKA, S.C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. **Journal of Andrology**, v.25, p.5-18, 2004.

SILVA, E.C.; CAJUEIRO, J.F.; SILVA, S.V.; SOARES, P.C.; GUERRA, M.M. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. **Theriogenology**, v.77, p.1722-1726, 2012.

SILVA, S.V.; GUERRA, M.M.P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, p.370-384, 2011.

SILVA, E.C.B.; GUERRA, M.M.P. Terapias antioxidantes na criopreservação espermática. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.107, p.143-149, 2012.

SOKIC-LAZIC, D.; MINTEER, S.D. Citric acid cycle biomimic on a carbon electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v.24, p.945-950, 2008.

STARKOV, A.A.; FISKUM, G. Regulation of brain mitochondrial H2O2 production by membrane potential and NAD(P)H redox state. **Journal of Neurochemistry**, v.86, p.1101-1107, 2003.

STEFANOV, R.; ANGELOVA, M.; STEFANOVA, T.; SUBEV, M.; DOLASHKA, P.; VOELTER, W.; ZACHARIEV, Z. Cu/Zn-superoxide dismutase from the fungal strain Humicola lutea 103 improves ram spermatozoa functions in vitro. **Andrologia**, v.36, p.51-56, 2004.

STOJANOVIC, S.; SPRINZ, H.; BREDE, O. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.391, p.79-89, 2001.

STOREY, B.T. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v.3, p.203-213, 1997.

STRUMIŁO, S. Short-term regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. **Acta Biochimica Polonica**, v.52, p.759-764, 2005.

THUWANUT, P.; CHATDARONG, K.; TECHAKUMPHU, M.; AXNÉR, E. The effect of antioxidants on motility, viability, acrosome integrity and DNA integrity of frozen-thawed epididymal cat spermatozoa. **Theriogenology**, v.70, p.233-240, 2008.

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

TREBERG, J.R.; QUINLAN, C.L.; BRAND, M.D. Evidence for two sites of superoxide production by mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I). **The Journal of Biological Chemistry**, v.286, p.27103-27110, 2011.

TURRENS, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **The Journal of Physiology**, v.552, p.335-344, 2003.

TURRENS, J.F.; ADOLFO ALEXANDRE.; LEHNINGER, A.L. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.237, p.408-414, 1985.

TURRENS, J. F.; BOVERIS, A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. **Biochemical Journal**, v.191, p.421-427, 1980.

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

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

VENDITTI, P.; DI STEFANO, L.; DI MEO, S. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. **Mitochondrion**, v.13, p.71-82, 2013.

VISCONTI, P.E.; KOPF, G.S. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v.59, p.1-6, 1998.

WALKER, J.E.; COLLINSON, I.R.; VAN RAAIJ, M.J.; RUNSSWICK, M.J. Structural analysis of ATP synthase from bovine heart mitochondria. **Methods in Enzymology**, v.260, p.163-190, 1995.

WRIGHT, J.S.; JOHNSON, E.R.; DILABIO, G.A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. **Journal of the American Chemical Society**, v.123, p.1173-1183, 2001.

YANG, B.; KOTANI, A. ARAI, K.; KUSU, F. Relationship of electrochemical oxidation of catechins on their antioxidant activity in microsomal lipid peroxidation. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.49, p.747-751, 2001.

ZRIBI, N.; CHAKROUN, N.F.; BEN ABDALLAH, F.; ELLEUCH, H.; SELLAMI, A.; GARGOURI, J.; REBAI, T.; FAKHFAKH, F.; KESKES, L.A. Effect of freezing-thawing process and quercetin on human sperm survival and DNA integrity. **Cryobiology**, v.65, p.326-331, 2012.

HIPÓTESE

A introdução da quercetina, com função antioxidante, aos meios de diluição na refrigeração e congelação pode reduzir os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) às células espermáticas durante o processo de criopreservação em equinos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a melhor concentração da quercetina capaz de promover manutenção da cinética e viabilidade espermática, durante a criopreservação.

- Avaliar o efeito da inclusão da concentração ótima de quercetina aos meios diluentes de refrigeração e congelação, sobre a cinética, integridade de membrana, produção de EROs e peroxidação lipídica.

- Avaliar se a adição da quercetina ao meio diluidor é capaz de imprimir significativa redução dos danos causados pelas EROs às células espermáticas de garanhões sensíveis à criopreservação, bem como de células submetidas a estresse térmico e químico.

CAPÍTULO 2

ARTIGO1 - MECANISMOS DE AÇÃO DOS PRINCIPAIS ANTIOXIDANTES UTILIZADOS NA CRIOPRESERVAÇÃO ESPERMÁTICA DE GARANHÕES

RESUMO

O emprego da criopreservação espermática na reprodução equina representou um grande avanço para o desenvolvimento da espécie. Entretanto a utilização de biotecnicas como a refrigeração e congelação espermática imprime sobre as células danos físicos e químicos que resultam em elevação nos níveis de espécies reativas do oxigênio (EROs), estresse oxidativo e injúrias irreversíveis aos espermatozoides. Visando amenizar as consequências do estresse oxidativo, diversas substancias com propriedades antioxidantes são adicionadas aos meios diluidores durante a criopreservação, apesar disto, na maioria das vezes o mecanismo de ação desencadeado por estes antioxidantes não é bem esclarecido. Diante disto, objetivou-se com o presente estudo referenciar os principais agentes antioxidantes utilizados na criopreservação de garanhões e seus mecanismos de ação.

Palavras-chave: radicais livres, antioxidantes, sêmen, equino

KEY OF MECHANISMS OF ACTION ANTIOXIDANTS USED IN CRYOPRESERVATION SPERM STALLIONS

ABSTRACT

The use of sperm cryopreservation in equine reproduction represented a major breakthrough for the development of the species. However the use of biotechnologies such as refrigeration and freezing sperm prints on the physical and chemical damage cells that result in increased levels of reactive oxygen species (ROS), oxidative stress and irreversible injury to sperm. Aiming to mitigate the consequences of oxidative stress, different substances with antioxidant properties are added to extenders for cryopreservation, despite this, most of the time the mechanism of action triggered by these antioxidants is not well understood. In view of this, the aim with this study reference the main antioxidants used in cryopreservation stallions and their mechanisms of action.

Keywords: free radicals, antioxidants, semen, equine

MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES USADOS EN LOS SEMENTALES SPERM CRIOPRESERVACIÓN

RESUMEN

El uso de la criopreservación de espermatozoides en reproducción equina representado un avance importante para el desarrollo de la especie. Sin embargo, el uso de las biotecnologías, como la refrigeración y congelación de esperma impresiones sobre las células de daños físicos y químicos que resultan en un aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), estrés oxidativo y el daño irreversible a los espermatozoides. Con el objetivo de mitigar las consecuencias del estrés oxidativo, se añaden diferentes sustancias con propiedades antioxidantes de diluyentes para la criopreservación, a pesar de esto, la mayoría de las veces el mecanismo de acción provocada por estos antioxidantes no se entiende bien. En vista de esto, el objetivo de este estudio de referencia los

principales antioxidantes utilizados en los sementales de criopreservación y sus mecanismos de acción.

Palabras clave: los radicales libres, los antioxidantes, el semen, caballo

INTRODUÇÃO

A utilização do sêmen criopreservado é uma prática amplamente utilizada na maioria das raças dentro da espécie equina, realizando-se biotécnicas como refrigeração e congelação de sêmen, que permitem a manutenção da viabilidade celular por tempo prolongado através da preservação pelo frio (1).

Diferente de outras espécies, os equinos geralmente não são selecionados de acordo com sua capacidade reprodutiva, levando-se em consideração, na maioria das vezes, exclusivamente a sua performance atlética ou características fenotípicas, em detrimento de sua qualidade seminal, acarretando em um grande número de garanhões com sêmen sensível à criopreservação (2).

Um dos fatores relacionados à queda na viabilidade dos espermatozoides equinos durante os processos de refrigeração e congelação é a alta predisposição destas células a sofrerem danos oxidativos resultantes da elevação nos níveis de espécies reativas do oxigênio (EROs) (3,4).

Em pequenas quantidades, as EROs desencadeiam eventos de sinalização celular e regulação da maturação, capacitação, hiperativação espermática, reação acrossomal e a união entre espermatozoide e oócito (5-7).

Entretanto, quando em elevadas concentrações são prejudiciais, levando ao estresse oxidativo, induzindo peroxidação lipídica, fragmentação do ácido desoxirribonucleico (DNA) e apoptose precoce das células (8). Neste contexto, a adição de agentes antioxidantes aos meios diluidores visa balancear a concentração de EROs objetivando reduzir os danos promovidos nos espermatozoides.

Diversos antioxidantes existentes têm sido utilizados como suplementos em meios diluidores de sêmen equino, dentre eles a superóxido dismutase (9), glutationa peroxidase (10), catalase (11,12), α-tocoferol (13-15), ácido ascórbico (11,14), butil-hidroxitolueno (BHT) (2, 12) e quercetina (16,17). Esta revisão bibliográfica visa atualizar os conhecimentos sobre a aplicação e os mecanismos de ação de alguns antioxidantes utilizados criopreservação de espermatozoides equinos.

METABOLISMO ESPERMÁTICO E FORMAÇÃO DAS ERO

Os espermatozoides são células altamente especializadas com a função de fertilizar e transferir o material genético masculino ao gameta feminino (18). Para se locomover e desempenhar sua função, as células espermáticas dos equinos têm como principal fonte de energia as moléculas de adenosina trifosfato (ATP), resultantes do metabolismo da glicose (19).

Durante o metabolismo espermático, a molécula de glicose e seus substratos passarão por etapas importantes, como a glicólise, passando pelo complexo piruvato-desidrogenase e ciclo do ácido cítrico (20). Ao longo destas etapas são formadas coenzimas reduzidas como as nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzida (NADH) e flavina-adenina-dinucleotídeo reduzida ($FADH_2$), e cada uma têm a função de carrear um par de elétrons, liberados durante as reações de desidrogenação ocorridas no metabolismo da glicose, direcionando-os à cadeia de transporte de elétrons (20,21).

A cadeia de transporte de elétrons é uma etapa regida por reações que ocorrem nos diversos complexos enzimáticos inclusos na membrana interna da mitocôndria. Ao todo são quatro complexos (I, II, III e IV) compostos por proteínas que têm a função de permitir e auxiliar no transporte de elétrons dentro da cadeia, resultando na transferência de energia para fosforilação oxidativa e síntese de ATP (22).

Os NADH atuando no complexo I e os FADH2 no complexo II, vão transferir seu par de elétrons para outra coenzima a ubiquinona (Q) se convertendo em ubiquinol (QH_2), que por sua vez tem a função de carrear os elétrons em direção a moléculas de citocromos C (Cit C) no complexo III, ao chegar no complexo IV os Cit C passam seus elétrons ao oxigênio (O_2), aceptor final dos elétrons na cadeia, formando moléculas de água (H_2O) (21).

Durante a transferência do par de elétrons dos NADH e $FADH_2$ às Q, bem como através da transferência dos elétrons dos QH_2 aos Cit C, ocorre a formação do radical intermediário, o ânion semiquinona (Q^-) que ocasionalmente é capaz de transferir este elétron desemparelhado a uma molécula de O_2 circulante, promovendo a formação da ERO radical superóxido (O_2^-) (23) (Figura 1).

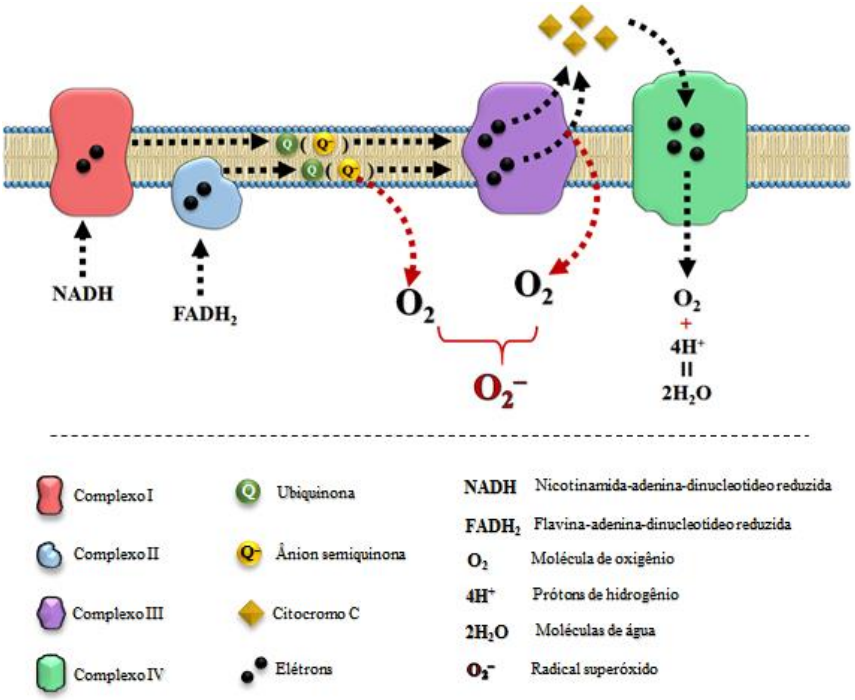

Figura 1. Formação do radical superóxido (O_2^-) durante a cadeia de transporte de elétrons.

Este aparentemente é o principal mecanismo responsável pela produção das EROs e sua ocorrência é mais comum nos complexos I e III, atribuindo-se uma probabilidade de efusão de elétrons, duas vezes maior ao complexo III quando comparado ao complexo I (24).

PRINCIPAIS EROs

As principais EROs conhecidas resultantes do metabolismo espermático são o O_2^-, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($OH^\bullet$) (21,25,26).

RADICAL SUPERÓXIDO (O_2^-)

O O_2^- é um radical livre formado a partir da reação entre um elétron livre e uma molécula de O_2, este é gerado principalmente durante a cadeia respiratória mitocondrial, e é o precursor da maioria das EROs (21,23) (Figura 2).

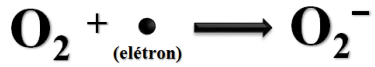

Figura 2. Reação entre uma molécula de oxigênio (O_2) e elétron livre promovendo a formação do radical superóxido (O_2^-).

A maior parte do O_2^- é produzido dentro da matriz mitocondrial, este radical livre é incapaz de atravessar as membranas lipídicas e tem vida curta sendo rapidamente convertido, por ação enzimática, à H_2O_2 (26-28).

PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H_2O_2)

O H_2O_2 é formado quando duas moléculas de O_2^- reagem com dois H^+, esta reação pode ocorrer espontaneamente ou catalisada por ação da enzima superóxido dismutase (SOD), comumente encontrada nas células dos mamíferos. (21,23,29) (Figura 3).

Figura 3. Formação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a partir da reação entre dois íons superóxido (O_2^-) e dois prótons de hidrogênio (H^+).

O H_2O_2 formado por dismutação do O_2^-, por possuir estabilidade em sua estrutura, não é considerado propriamente um radical livre, entretanto é precursor na formação de uma potente ERO, o $OH^•$, além disto o H_2O_2 possui meia-vida longa e capacidade de se difundir através das membranas biológicas (7,23,30,31).

RADICAL HIDROXIL ($OH^•$)

O $OH^•$ é considerado um dos mais potentes agentes oxidantes, sendo capaz de atravessar membranas e reagir com moléculas tais como lipídeos insaturados das membranas e DNA. Este é formado a partir do H_2O_2 e sua estrutura é composta por um átomo de hidrogênio ligado a um átomo de oxigênio, onde um dos elétrons do O_2 encontra-se desemparelhado (23).

Este radical é formado quando uma molécula de H_2O_2 recebe um elétron livre, decorrendo de reações envolvendo o íon férrico (Fe^{2+}) ou íon cobre (Cu^+), denominada reação de Fenton (7,21) (Figura 4), ou quando um H_2O_2 recepta um elétron proveniente do O_2^-, denominada reação de Haber-Weiss (7,30) (Figura 5).

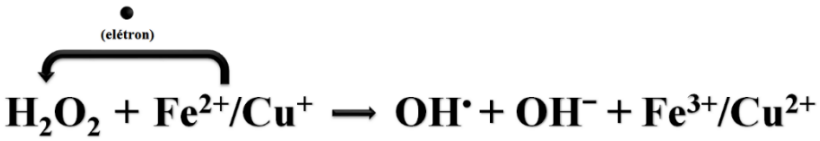

Figura 4. Reação de Fenton.

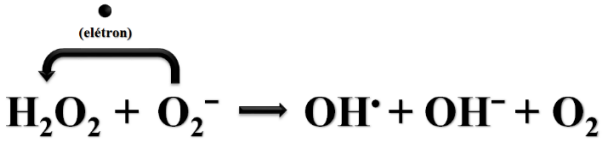

Figura 5. Reação de Haber-Weiss.

PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

As células espermáticas dos mamíferos contêm em sua membrana uma concentração elevada de ácidos graxos polinsaturados, embora a presença de elevadas concentrações destes ácidos graxos garanta maior fluidez e flexibilidade à membrana do espermatozoide, também a torna mais susceptível à ação deletéria das EROs, que são capazes de desencadear uma sequência de reações resultando, por vezes, em lesão irreversível à membrana (6,30,32).

O processo de peroxidação lipídica deocorre principalmente da ação do $OH^{\bullet}$, que ao sequestrar um H^+ de um ácido graxo polinsaturado pertencente à bicamada fosfolipídica das membranas celulares, promove a desestabilização deste formando uma região de instabilidade, o radical alquil ($R^{\bullet}$), possuindo um elétron despareado. Este por sua vez, reage com uma molécula de O_2 podendo formar outros dois radicais, alcoxil ($RO^{\bullet}$) ou peroxil ($ROO^{\bullet}$), que tendem a se estabilizar retirando uma molécula de H^+ e um elétron pertencentes aos fosfolipídeos adjacentes, formando hidroperóxido lipídico (ROOH) e levando a formação de um novo $R^{\bullet}$, promovendo uma reação em cadeia. (30,33) (Figura 6).

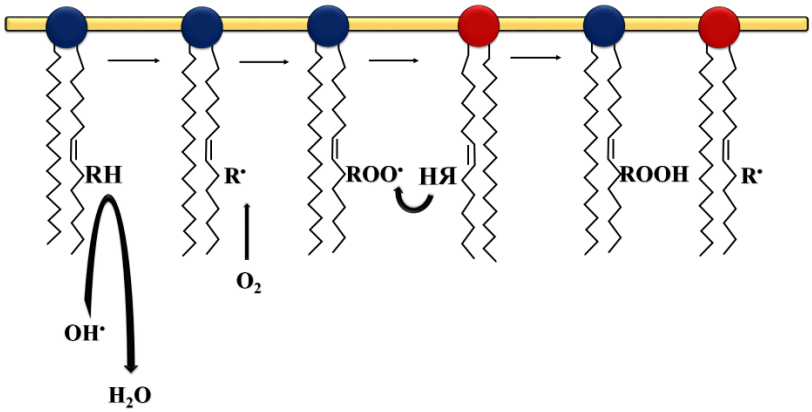

Figura 6. Esquematização da reação em cadeia ocorrida durante a peroxidação lipídica.

Caso esta sequência de reações não seja interrompida, pode resultar na comunicação entre duas regiões de instabilidade ($R^{\bullet}$—$R^{\bullet}$, $R^{\bullet}$—$ROO^{\bullet}$ ou $ROO^{\bullet}$—$ROO^{\bullet}$) e esta reação é incompatível com a manutenção da estrutura da membrana afetando sua fluidez, elasticidade e permeabilidade, resultando em perda de viabilidade celular (34)

Os íons metálicos de ferro e cobre, também são capazes de desencadear a peroxidação lipídica, podendo doar ou sequestrar elétrons dos ROOH promovendo desestabilização do ácido graxo reiniciando a reação em cadeia (33) (Figura 7).

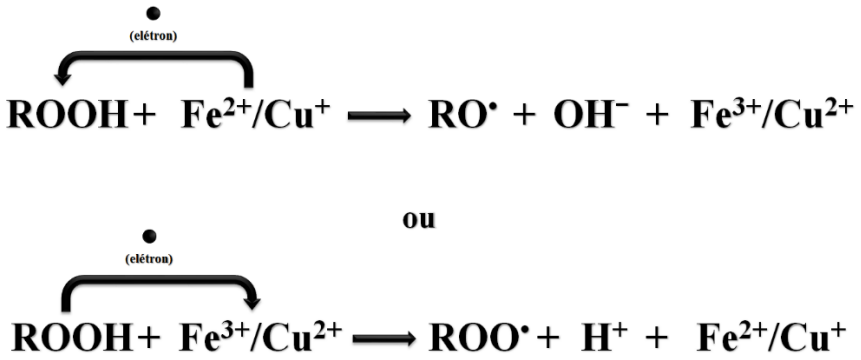

Figura 7. Participação dos íons metálicos (Fe^{2+}/Cu^{+} ou Fe^{3+}/Cu^{2+}) da desestabilização do hidroperóxido lipídico (ROOH) e desencadeamento da peroxidação lipídica.

CRIOINJÚRIAS

Durante o processo de criopreservação os espermatozóides são submetidas a injúrias decorrente do estresse térmico, o que promove alterações funcionais e estruturais às células, podendo resultar em queda na motilidade e comprometimento da capacidade de fertilizar (26).

É sugerido que durante a preservação pelo frio as mitocôndrias podem sofrer danos, levando ao comprometimento do metabolismo energético dos espermatozoides e aumento na produção de EROs, sendo relacionado com redução na cinética espermática e maior fragmentação de DNA (35).

Além disto a maior ocorrência de peroxidação lipídica, resultante da elevação nos níveis de EROs, é considerada um dos principais danos causados pela criopreservação por promover desestruturação e aumento da permeabilidade da membrana, sendo indicado como um importante causador de danos subletais às células espermáticas nos equinos (3,36). Observou-se que quando há o aumento da produção de peróxidos lipídicos ($R^{\bullet}$ ou $ROO^{\bullet}$) ocorre uma queda na motilidade espermática, reduzindo a capacidade da fertilização (25).

Portanto a incorporação de agentes antioxidantes aos meios diluidores durante a refrigeração e congelação espermática é indicado como uma importante ferramenta para reduzir os danos decorrentes da elevação nos níveis de EROs resultantes do processo de criopreservação.

PRINCIPAIS ANTIOXIDANTES E SUAS FUNÇÕES

Durante o metabolismo oxidativo que ocorre nas mitocôndrias, cerca de 0,1 a 4% do O_2 utilizado na respiração promovem a formação de O_2^{-}, quantidade mais que suficiente para induzir efeitos deletérios às células, necessitando que estes radicais sejam rapidamente neutralizados por agentes antioxidantes (20).

Para tal, as células espermáticas possuem compostos com função de combater o excesso de EROs e manter a homeostase celular, além disto são amplamente adicionadas aos meios diluidores de sêmen, substâncias naturais e sintéticas com funções antioxidantes (25).

Os antioxidantes nas células espermáticas agem basicamente de duas maneiras, eles podem impedir a produção das EROs ou interromper a reação em cadeia que ocorre durante peroxidação lipídica (37). Podendo ser definidos como enzimáticos, quando sua função antioxidante é desempenhada por enzimas, e não enzimáticos (38).

ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

Os antioxidantes enzimáticos compõem o primeiro sistema de defesa a agir nas células, neutralizando o excesso de EROs e prevenindo danos à estrutura celular. Fazem parte deste grupo, principalmente, a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx) que em ação conjunta convertem O_2^- em H_2O (27,39).

SUPERÓXIDO DISMUTASE

A SOD é um antioxidante enzimático encontrado na matriz mitocondrial, no citosol e no plasma seminal, tem a função de converter duas moléculas de O_2^- em H_2O_2 e O_2, através de reação de dismutação (29) (Figura 8).

$$2O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

Figura 8. Reação de formação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) catalisada pela enzima superóxido desmutase (SOD).

Segundo Kankofer et al. (40), foi encontrada significativa atividade antioxidante no plasma seminal resultante da presença da enzima SOD. Foi observado também que a administração exógena de SOD ao ejaculado equino promoveu resultados significativo dos parâmetros de motilidade progressiva e integridade de membrana (9).

GLUTATIONA PEROXIDASE

Outra enzima amplamente encontrada nas células é a GPx, presente na matriz mitocondrial, espaço intermembranas e citosol. Sua função antioxidante é executada ao retirar H^+ e elétrons de duas moléculas de glutationa reduzida (GSH) doando-os ao H_2O_2, resultando em duas moléculas de H_2O e uma de glutationa oxidada (GSSG) (21,23) (Figura 9).

$$H_2O_2 + 2GSH \xrightarrow{GPx} 2H_2O + GSSG$$

Figura 9. Ação da glutationa-peroxidase (GPx) na remoção do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), convertendo glutationa reduzida (GSH) em glutationa oxidada (GSSG).

A ação da GPx nos epermatozóides dos mamíferos é responsável por reduzir a ocorrência de peroxidação lipídica em virtude de sua capacidade em reduzir os níveis de H2O2 circulantes (41).

Oliveira et al. (10) em estudo com a espécie equina, foi observado que a adição de 2,5 mM de glutationa peroxidase ao meio diluidor para congelação foi capaz de preservar motilidade total, motilidade progressiva, viabilidade e integridade da membrana plasmática, entretanto, concentrações acima de 2,5mM deste antioxidante promoveram efeito deletério sobre espermatozoides.

CATALASE

A CAT também é responsável por decompor as moléculas de H_2O_2, convertendo-as a H_2O e O_2. Normalmente localiza-se nos peroxissomos, que são organelas presentes no citosol das células dos organismos eucariontes (38) (Figura 10).

Figura 10. Conversão de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) à água (H_2O) e oxigênio (O_2) por ação da catalase (CAT).

Apesar da comprovada função antioxidante representada pela CAT, Arich et al. (11), observaram que a inclusão de 1.8 unidades/L deste antioxidante ao meio diluidor para refrigeração de equinos implicou em menores parâmetros de cinética espermática e integridade de membrana após 24 horas de refrigeração a 5ºC.

Já em estudo semelhante, Ball et al. (12) ao avaliar a ação da CAT sobre o sêmen equino refrigerado a 5ºC durante 72 horas, apesar de não terem observado melhores índices de motilidade espermática, foi evidenciado maior manutenção da integridade acrossomal para as amostras acondicionadas na ausência do plasma seminal e tratadas com o antioxidante.

Em alguns casos, a linha primária de defesa contra as EROs, representada pelos antioxidantes enzimáticos, é insuficiente para promover redução satisfatória dos agentes oxidantes e homeostase celular aos espermatozoides, sendo necessário lançar mão da inclusão de antioxidantes não enzimáticos naturais ou sintéticos aos meios diluentes de sêmen (40).

ANTIOXIDANTES NÃO ENZIMÁTICOS

Os antioxidantes não enzimáticos são substâncias de baixo peso molecular que atuam como removedores dos agentes causadores dos danos oxidativos ou como reparadores da lesão já iniciada. Estes podem ser de origem natural, geralmente provenientes de vegetais, ou de origem sintética (42).

Dentre os antioxidantes não enzimáticos envolvidos na reprodução, destacam-se o ácido ascórbico (vitamina C), o α-tocoferol (vitamina E), butil-hidroxitolueno (BHT) e quercetina (6,12,16,42).

VITAMINA E (α-TOCOFEROL)

A vitamina E ou α-tocoferol ($C_{29}H_{50}O_2$) (Figura 11), é um poderoso antioxidante, lipossolúvel, presente na membrana interna das mitocôndrias, com a função de doar elétrons e H^+ ao $ROO^{\bullet}$, interrompendo a reação em cadeia durante a peroxidação lipídica (31) (Figura 12).

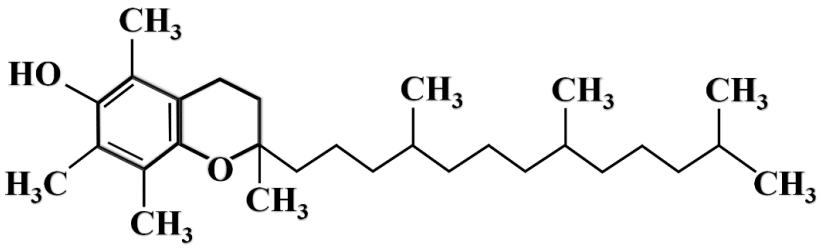

Figura 11. Estrutura molecular do α-tocoferol.

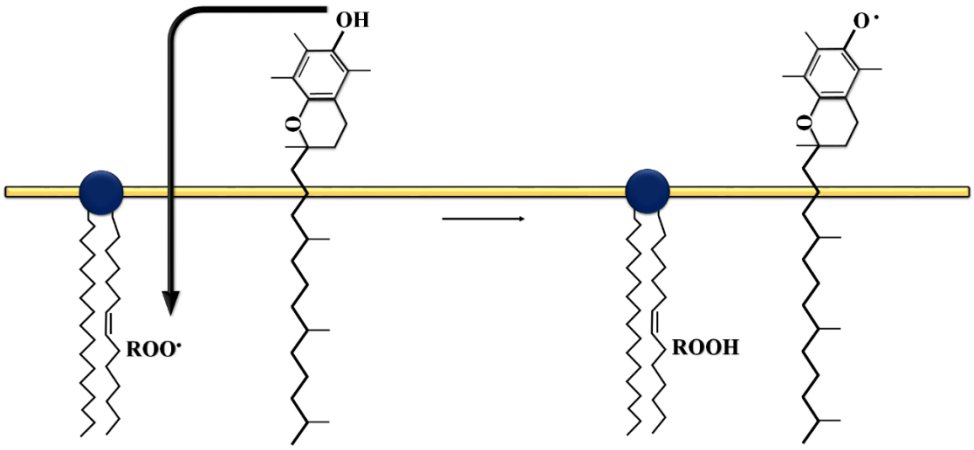

Figura 12. Mecanismo de ação do α-tocoferol estabilizando o radical peroxil interrompendo a peroxidação lipídica,

Em estudo de Yousefian et al. (15), não foi notado efeito positivo da inclusão da vitamina E sobre a cinética espermática, integridade de membranas ou lipoperoxidação durante a refrigeração do sêmen equino.

Já Almeida & Ball (13), observaram que a inclusão do α-tocoferol no sêmen fresco de garanhões resultou em maior número de espermatozoides com motilidade progressiva sem que houvesse redução da peroxidação lipídica, entretanto quando as amostras forma submetidas à refrigeração a 5ºC por 48 horas, a inclusão do antioxidante resultou em menores índices de peroxidação lipídica.

Resultados semelhantes foram encontrados por Franco et al. (14) em estudo com sêmen equino congelado, evidenciando que a incorporação de α-tocoferol ao meio diluidor promoveu menores índices de peroxidação lipídica e maior viabilidade celular.

VITAMINA C (ÁCIDO ASCÓRBICO)

Outro importante antioxidante não enzimático é a vitamina C ou ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$) (Figura 13), esta funciona como agente redutor doando elétrons e H^+ às EROs, convertendo-as em espécies inofensivas e devido ao seu caráter hidrossolúvel, é incapaz de debelar diretamente a peroxidação lipídica, agindo em associação com a vitamina E para executar tal função (43) (Figura 14).

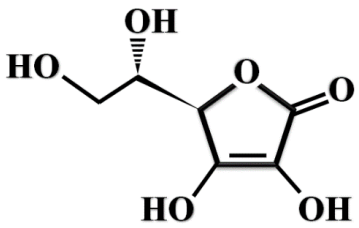

Figura 13. Estrutura molecular do ácido ascórbico.

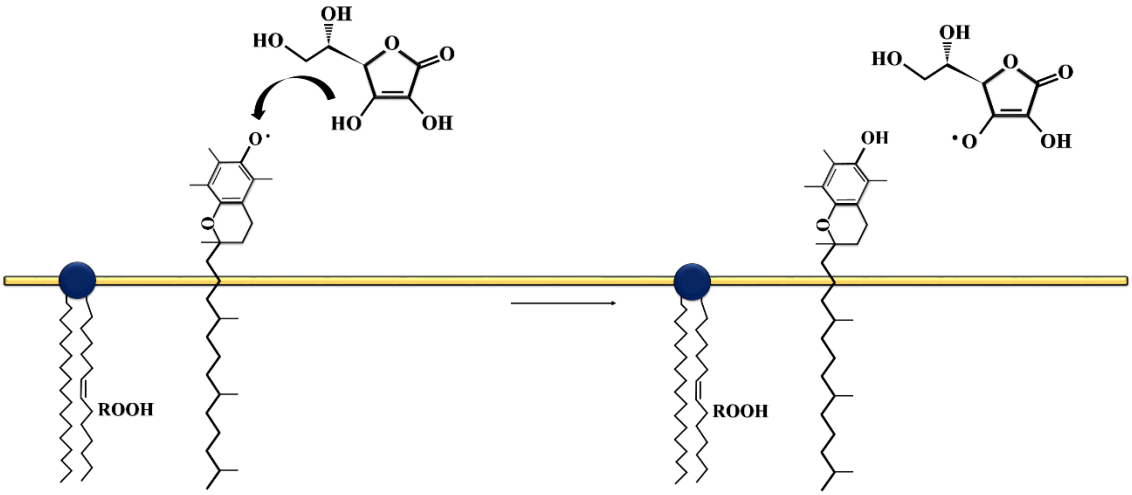

Figura 14. Ácido ascórbico promovendo a estabilização do α-tocoferol durante a peroxidação lipídica.

A inclusão de ácido ascórbico no meio diluidor de refrigeração para sêmen equino, na concentração de 0,9 g/L, para as amostras mantidas à 5ºC durante 24, 48 e até 72 horas, resultou em melhores índices de integridade de membrana quando comparado aos grupos desprovidos deste antioxidante (11).

Em contrapartida, é sugerido que a vitamina C também apresente uma função pró-oxidante, sendo capaz de doar elétrons aos íons metálicos Fe^{3+} e Cu^{2+}, tornando-os compostos metálicos reduzidos, que vão participar da reação de Fenton, convertendo H_2O_2 à $OH^{\bullet}$ e imprimindo danos às biomoléculas (16,31) (Figura 15).

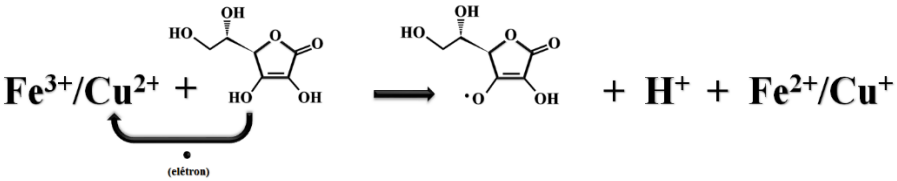

Figura 15. Esquematização da função pró-oxidante do ácido ascórbico, doando elétrons aos íons metálicos causadores da reação de Fenton.

Em estudos com sêmen congelado de garanhões, embora a inclusão de concentrações baixas deste antioxidante não tenha apresentado impacto sobre a viabilidade celular, elevadas concentrações resultaram em maior ocorrência de peroxidação lipídica e promoção de instabilidade à membrana plasmática (14).

COMPOSTOS FENÓLICOS

Entre os antioxidantes não enzimáticos, os compostos fenólicos têm significativa importância. Estes são caracterizados por possuir em sua estrutura um ou mais anéis aromáticos ligados a grupamentos hidroxila (OH). Neste grupo de compostos destacam-se o butil-hidroxitolueno e a quercetina, sendo considerados antioxidantes mais eficientes do que as vitaminas E e C (44).

BUTIL-HIDROXITOLUENO (BHT)

O BHT ($C_{15}H_{24}O$) (Figura 16) é um antioxidante sintético do grupo dos fenóis, análogo da vitamina E, que está envolvido principalmente na reação de conversão dos radicais peroxil em hidroperóxidos lipídicos, doando de H^+ e elétrons e interrompendo a ração em cadeia durante a peroxidação lipídica, sendo considerado desta maneira um eficiente protetor de membrana (45) (Figura 17).

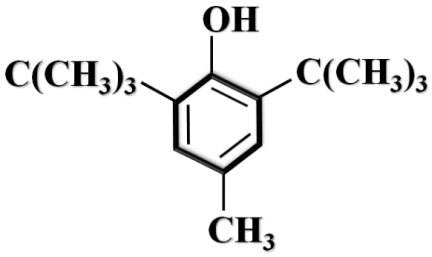

Figura 16. Estrutura molecular do butil-hidroxitolueno (BHT).

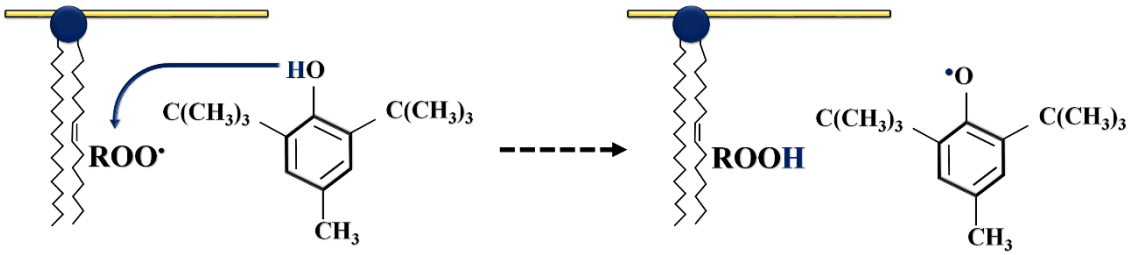

Figura 17. Mecanismo de ação do butil-hidroxitolueno (BHT) interrompendo a reação em cadeia ocorrida durante a peroxidação lipídica.

O BHT foi testado em búfalos (46), touros (47), cães (48) e suínos (49) demonstrando aumento na motilidade, integridade de membrana plasmática e viabilidade espermática. Desta forma o BHT mostra-se uma opção promissora para reduzir os danos causados pelas EROs e promover maior longevidade aos espermatozoides, no entanto, há poucos estudos avaliando-se a influência do BHT no sêmen de equino, Ball et al. (12) não obtiveram resultados favoráveis com a inclusão de BHT em meio diluidor para refrigeração de sêmen equino. Morillo-Rodríguez et al. (2), em estudo com sêmen congelado de garanhões, também não encontraram efeito significativo da inclusão de 1 mM de BHT no meio, não interferindo nos parâmetros de cinéticas espermática ou integridade das membranas.

QUERCETINA

A quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxiflavona) é um antioxidante natural não enzimático, do grupo dos flavonoides, amplamente encontrado nas frutas, legumes, sementes, nozes e vinho tinto (28). Seu arranjo molecular é caracterizado como um polifenol flavonoide, possuindo cinco grupamentos OH em sua estrutura (50) (Figura 17).

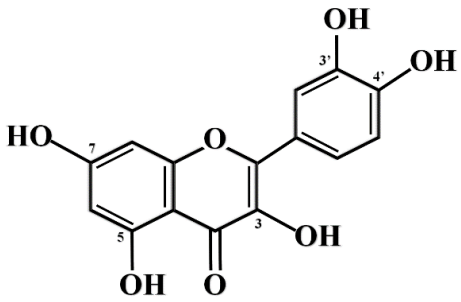

Figura 17. Estrutura molecular da quercetina.

O potencial antioxidante dos compostos flavonóides está diretamente ligado à quantidade de OH presentes em sua estrutura. Quanto mais grupamentos OH um flavonoide possui maior sua capacidade de doar elétrons e H^+ (31,50). Os flavonoides monoidroxilados possuem baixa capacidade antioxidante, já os flavonoides com múltiplas OH, como é o caso da quercetina, são considerados eficientes inativadores de EROs (31).

Em virtude da grande quantidade de OH encontradas em sua estrutura, a quercetina possui eficiente capacidade antioxidante, possibilitando a doação de até cinco elétrons e H^+ às EROs, estabilizando-as (37).

A quercetina pode promover sua ação antioxidante de três maneiras, reagindo com os radicais O_2^- e $OH^\bullet$, agindo como quelante de íons metálicos ou interrompendo a continuidade da peroxidação lipídica (51).

De acordo com Chen et al., (52), este flavonoide é capaz de reduzir consideravelmente as concentrações de O_2^-, além de possuir a capacidade de reagir diretamente com o $OH^\bullet$, doando elétrons e H^+ para este radical resultando na formação de H_2O (43,52) (Figura 18).

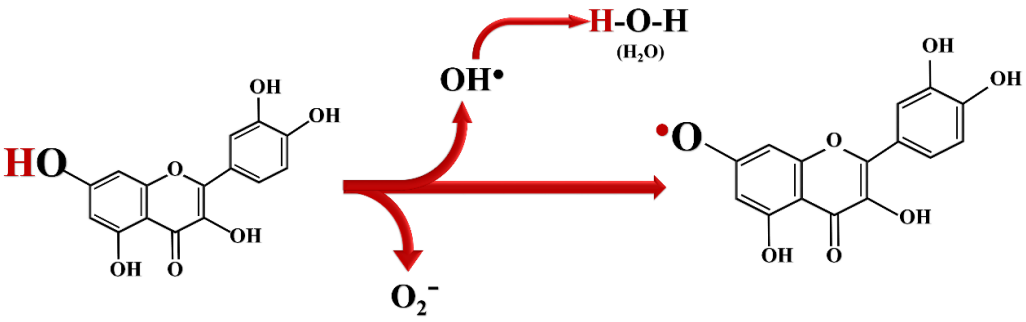

Figura 18. Ação da quercetina estabilizando os radicais superóxido (O_2^-) ou radical hidroxil ($OH^\bullet$).

Este antioxidante também tem a capacidade de atuar como quelante de íons metálicos, reagindo e impedindo que o íon Fe^{2+} doe elétrons para o H_2O_2 interrompendo a reação de Fenton e formação do $OH^\bullet$ (53). Além de minimizar também a participação deste íon metálico no desencadeamento direto da peroxidação lipídica (33) (Figura 19).

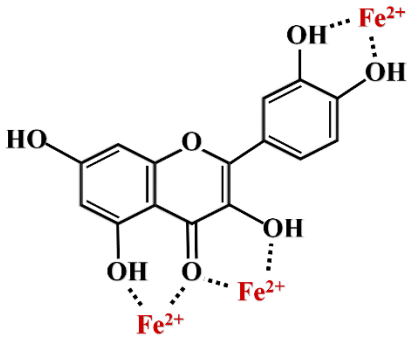

Figura 19. Esquematização da função da quercetina como quelante do íon férrico (Fe^{2+}).

Outra possibilidade de ação antioxidante executada pela quercetina durante a peroxidação lipídica ocorre em decorrência deste flavonoide possuir caráter lipofílico, sendo capaz de interagir com a bicamada lipídica e permitindo a doação direta de H^+ e elétrons a radicais como o $ROO^{\bullet}$, estabilizando e convertendo-os a ROOH, impedindo assim a continuidade da reação em cadeia (31,51) (Figura 20).

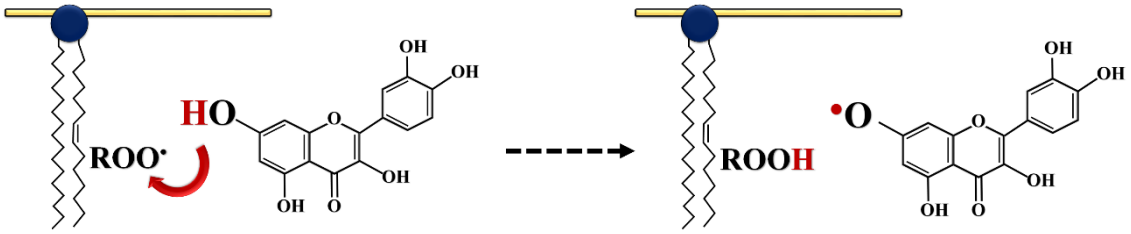

Figura 20. Bloqueio à reação em cadeia durante a peroxidação lipídica por ação da quercetina, ao doar um elétron e um próton (H^+) ao radical peroxil ($ROO^{\bullet}$) formando hidroperóxido lipídico (ROOH).

A adição de 0,1 mM de quercetina ao meio de refrigeração para sêmen de equinos mantido à 5°C por até 144 horas resultou em maior preservação da motilidade espermática total, maior integridade de membrana, maiores níveis intracelulares de ATP e menor peroxidação lipídica (16).

Gibb et al., (17), em estudo com utilização da quercetina no sêmen congelado de equinos observaram que a inclusão do antioxidante promoveu redução nos níveis de fragmentação de DNA e aumento da motilidade total dos espermatozoides.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora o avanço na utilização do sêmen criopreservado de garanhões promova cada vez mais a necessidade de inclusão de antioxidantes nos meios diluidores, ainda há resultados controversos com relação à eficácia de determinados agentes antioxidantes dentro da espécie, necessitando-se de aprofundamento sobre as interações das substancias com as células espermática e suas possíveis consequências.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão do auxílio à pesquisa (Processo nº 2014/01681-4).

REFERÊNCIAS

1. Nouri H, Towhidi A, Zhandi M, Sadeghi R. The effects of centrifuged egg yolk used with INRA plus soybean lecithin extender on semen quality to freeze miniature caspian horse semen. Journal of Equine Veterinary Science. 2013;33:1050-1053.

2. Morillo-Rodríguez A, Macías-García B, Tapia JA, Ortega-Ferrusola C, Peña FJ. Consequences of butylated hydroxytoluene in the freezing extender on post-thaw characteristics of stallion spermatozoa in vitro. Andrologia. 2012;44:688-695.

3. Ortega-Ferrusola C, Gonzalez FL, Morrell JM, Salazar SC, Macías-García 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.

4. García BM, Fernández LG, Ferrusola CO, Rodríguez AM, Bolaños JMG, Martinez HR, Tapia JA, Morcuende D, Peña FJ. Fatty acids and plasmalogens of the phospholipids of the sperm membranes and their relation with the post-thaw quality of stallion spermatozoa. Theriogenology. 2011;75:811-818.

5. Aitken RJ, Harkiss D, Knox W, Paterson M, Irvine DS. A novel signal transduction cascade in capacitating human spermatozoa characterised by a redox-regulated, cAMP-mediated induction of tyrosine phosphorylation. Journal of Cell Science. 1998;111:645-656.

6. Lenzi A, Gandini L, Lombardo F, Picardo M, Maresca V, Panfili E, Tramer F, Boitani C, Dondero F. Polyunsaturated fatty acids of germ cell membranes, glutathione and blutathione-dependent enzyme-PHGPx: from basic to clinic. Contraception. 2002; 65:301-304.

7. Ford WCL. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. Human Reproduction Update. 2004;10:387-399.

8. 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.

9. Cocchia N, Pasolini MP, Mancini R, Petrazzuolo O, Cristofaro I, Rosapane I, Sica A, Tortora G, Lorizio R, Paraggio G, Mancini A. Effect of sod (superoxide dismutase) protein supplementation in semen extenders on motility, viability, acrosome status and ERK (extracellular signal-regulated kinase) protein phosphorylation of chilled stallion spermatozoa. Theriogenology. 2011;75:1201-1210.

10. Oliveira RA, Wolf CA, Oliveira MA, Gambarini ML. Addition of glutathione to na extender for frozen equine sêmen. Journal of Equine Veterinary Science. 2013;33:1148-1152.

11. Aurich JE, Schönherr U, Hoppe H, Aurich C. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. Theriogenology. 1997;48:185-192.

12. 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.

13. Almeida J, Ball BA. Effect of α-tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. Animal Reproduction Science. 2005;87:321-337.

14. Franco JSV, Chaveiro A, Góis A, Silva FMS. Effects of α-tocopherol and ascorbic acid on equine semen quality after cryopreservation. Journal of Equine Veterinary Science. 2013;33:787-793.

15. 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. 2014;34:949-954.

16. Mcniven MA, Richardson GF. Chilled storage of stallion semen using perfluorochemicals and antioxidants. Cell Preservation Technology. 2003;1:165-174.

17. Gibb Z, Butler TJ, Morris LH, Maxwell WM, Grupen CG. Quercetin improves the postthaw characteristics of cryopreserved sex-sorted and nonsorted stallion sperm. Theriogenology. 2013;79:1001-1009.

18. Varner DDD, Gibb Z, Aitken RJ. Stallion fertility: A focus on the spermatozoon. Equine Veterinary Journal. 2015;47:16-24.

19. Varner D, Johnson L. From a sperm's view – revisiting our perception of this intriguing cell. AEEP Proceedings. 2007;53:104-177.

20. Nelson DL, Cox MM. Lehninger Princípios da Bioquímica, 6.ed. Porto Alegre: Artmed; 2014.

21. Venditti P, Di Stefano L, Di Meo S. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. Mitochondrion. 2013;13:71-82.

22. Lenaz G, Fato R, Formiggini G, Genova ML. The role of coenzyme Q in mitochondrial electron transport. Mitochondrion. 2007;7:S8-S33.

23. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. The Journal of Physiology. 2003;552:335-344.

24. Kussmaul L, Hirst J. The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2006;103:7607-7612.

25. Lenzi A, Gandini L, Picardo M, Tramer F, Sandri G, Panfili E. Lipoperoxidation damage of spermatozoa polyunsaturated fatty acids (PUFA): scavenger mechanisms and possible scavenger therapies. Frontiers in Bioscience. 2000;5:1-15.

26. Maia MS, Bicudo SD. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. Revista Brasileira de Reprodução Animal. 2009;33:183-193.

27. Lenaz G. The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanisms and implications in human pathology. International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life. 2001;52:159-164.

28. Nogueira BG, Bitencourt JL, Sampaio BFB, Bender ESC, Costa e Silva EV, Zúccari CESN. Peroxidação lipídica e agentes antioxidantes no sêmen de mamíferos. Revista Eletrónica Veterinária. 2013;15:1-15.

29. Lambert AJ, Brand MD. Superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane. Biochemical Journal. 2004;382:511-517.

30. Griveau JF, Le Lannou D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. International Journal of Andrology. 1997;20:61-69.

31. Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. Química Nova. 2006;29:113-123.

32. Salmani H, Nabi MM, Vaseghi-Dodaran H, Rahman MB, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Shakeri M, Towhidi A, Shahneh AZ, Zhandi M. Effect of glutathione in soybean lecithin-based semen extender on goat semen quality after freeze-thawing. Small Ruminant Research. 2013;112:123-127.

33. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration. Where are we now? Journal of Neurochemistry. 2006;97:1634-1658.

34. Catala A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology. 2006;38:1482-1495.

35. Schober D, Aurich C, Nohl H, Gille L. Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine spermatozoa. Theriogenology. 2007;68:745-754.

36. Alvarez JG, Storey BT. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. Journal of Andrology. 1992;13:232-241.

37. Silva ECB, Guerra MMP. Terapias antioxidantes na criopreservação espermática. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias. 2012;107:143-149.

38. Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. Biochemistry. 2005;70:200-214.

39. Nogueira BG, Bitencourt JL, Sampaio BFB, Bender ESC, Costa e Silva EV, Zúccari CESN. Peroxidação lipídica e agentes antioxidantes no sêmen de mamíferos. Revista Eletrónica Veterinária. 2013;15:1-15.

40. 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.

41. Alvarez G, Storey BT. Role of glutathione peroxidase in protecting mammalian spermatozoa from loss of motility caused by spontaneous lipid peroxidation. Gamete Research. 1989;23:77-90.

42. Andrade ER, Melo-Sterza FA, Seneda MM, Alfieri AA. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. Revista Brasileira de Reprodução Animal. 2010;34:79-85.

43. Wright JS, Johnson ER, Dilabio GA. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. Journal of the American Chemical Society. 2001;123:1173-1183.

44. Stojanovic S, Sprinz H, Brede O. Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2001;391:79-89.

45. Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. Journal of Reproduction and Fertility. 1988;81:459-469.

46. 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.

47. 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;43:311-314.

48. 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.

49. Trzcińska M, Bryła M, Gajda B, Gogol P. Fertility of boar semen cryopreserved in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. Theriogenology. 2015;83:307-313.

50. Alrawaiq NS, Abdullah A. A review of flavonoid quercetin: metabolism, bioactivity and antioxidant properties. International Journal of PharmTech Research. 2014;6:933-941.

51. Afanas'ev IB, Dorozhko AI, Brodskii AV, Kostyuk VA, Potapovitch AI. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. Biochemical Pharmacology. 1989;38:1763-1769.

52. Chen Y, Zheng R, Jia Z, Ju Y. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. Free Radical Biology and Medicine. 1990;9:19-21.

53. Gülçin I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. Archives of Toxicology. 2012;86:345-391.

ARTIGO 2 - Redução do estresse oxidativo no sêmen criopreservado de garanhões a partir da incorporação da quercetina ao meio diluidor

Artigo redigido segundo as normas da Theriogenology, ISSN 0093-691X, ranqueada como A2 pelo QUALIS – CAPES de 2015.

Resumo

Dentre os impactos negativos resultantes do estresse térmico durante a refrigeração e congelação do sêmen equino, o aumento nos níveis de espécies reativas do oxigênio (EROs) é um dos mais prejudiciais, resultando em danos severos às biomoléculas. A quercetina é considerada um antioxidante bastante eficaz, por ser capaz de reagir com as principais EROs, reduzindo seus efeitos deletérios. O objetivo deste foi determinar a melhor concentração de quercetina a ser utilizada na criopreservação do sêmen de garanhões e o efeito da incorporação deste antioxidante aos meios de refrigeração (Botu-Sêmen®) e congelação (Botu-Crio®). No experimento 1 cada ejaculado (n=8) foi dividido em quatro tratamentos: Controle e Q20 (20µg), Q30 (30µg) e Q45 (45µg) de quercetina/mL de Botu-Sêmen®, as amostras foram refrigeradas durante 24 horas a 5˚C e avaliadas para cinética espermática e integridade de membranas. No experimento 2 cada ejaculado (n=42) foi separado em Controle e Q20 e submetido a refrigeração a 5˚C por 24 horas, assim como, foi avaliado o efeito do tratamento com quercetina sobre garanhões que resistentes à refrigeração (RR) ou sensíveis à refrigeração (SR). No experimento 3, analisou-se os ejaculados (n=42) submetidos à congelação em meio Controle e Q20c (20µg de quercetina/mL de Botu-Crio®), considerando também o impacto do tratamento sobre o ejaculado de garanhões resistentes à congelação (RC) ou sensíveis à congelação (SC). Para os experimentos 2 e 3 avaliou-se a cinética espermática e danos oxidativos através da citometria de fluxo. No experimento 4 cada ejaculado (n=10) foi refrigerado à 5˚C por 24 horas, diluído em Controle ou Q20, e submetido à estresse por adição de ácido aracdônico, avaliando-se o estresse oxidativo por citometria de fluxo após a manipulação. A concentração de 20µg/mL foi selecionada como a melhor a ser utilizada no ejaculado de garanhões, visto que as doses mais elevadas (30 e 45 µg/mL) implicaram em redução na motilidade espermática. O tratamento com quercetina durante a refrigeração do sêmen equino não implicou em beneficio à cinética espermática ou redução no estresse oxidativo, entretanto a adição deste antioxidante durante a congelação foi capaz de reduzir os danos oxidativos causados aos espermatozoides, em especial dos garanhões considerados SC. Para as células refrigeradas submetidas à estresse por ácido aracdônico a adição da quercetina mostrou relevante capacidade de controlar os danos oxidativos. Portanto a incorporação de 20 µg/mL de quercetina ao meio é efetiva em reduzir os danos oxidativos das células submetidas à congelação ou quimicamente estressadas.

1. Introdução

A utilização de biotecnologias de criopreservação do sêmen do garanhão como a refrigeração e congelação espermáticas, são de considerável importância para os programas de reprodução na espécie equina. Através destas é possível disseminar o material genético de garanhões superiores a longas distâncias sem que seja necessário o seu deslocamento, mantendo a viabilidade espermática a 5°C por até 48 horas ou até mesmo preservando as células espermáticas por tempo indeterminado [1-3]

Apesar das vantagens apresentadas por estas biotecnologias, elas imprimem sobre os espermatozoides uma série de alterações físicas e químicas, que resultam em considerável produção de radicais instáveis, as espécies reativas do oxigênio (EROs) [4]. A atividade das EROs é necessária para que espermatozoides realizem funções fisiológicas como capacitação, hiperativação, reação acrossomal e fusão com o oócito, entretanto, um desequilíbrio na produção destes agentes oxidantes resulta em danos severos às biomoléculas [5-9].

Dentre as injúrias causadas às células pelas EROs, a peroxidação lipídica é uma das mais significativas. Esta é responsabilizada por comprometer a estrutura das membranas celulares resultando em desequilíbrio osmótico, perda de motilidade e viabilidade espermática [10-13].

Em virtude disto, várias substâncias com função antioxidante têm sido adicionadas aos meios de refrigeração e congelação de sêmen, como a superóxido dismutase [14-17], glutationa peroxidase [14,15,17-19], catalase [15, 17, 20-22], α-tocoferol [21,22], ácido ascórbico [20-23], Butil-hidroxitolueno [21], e dentre outros, os antioxidantes polifenóis, em especial os favonoides, que são considerados importantes aliados no combate ao excesso de EROs.

A quercetina é um flavonoide com estrutura química rica em grupamentos hidroxila (OH), esta característica permite a este antioxidante reagir com radicais livres estabilizando-os [24,25]. Em virtude disto, ela possui capacidade de reduzir a ocorrência de peroxidação lipídica ou interrompê-la caso já tenha sido iniciada [26,27].

Além das características já referenciadas, a quercetina é capaz de agir como quelante de íons metálicos, minimizando a formação de radicais hidroxil ($OH^{\bullet}$) através da reação de Fenton e também de reduzir a participação destes íons metálicos no desencadeamento da peroxidação lipídica [28-30].

Apesar de sua comprovada capacidade em reduzir os danos causados pelo estresse oxidativo, pouco se sabe sobre o efeito da adição da quercetina ao ejaculado equino durante o processo de refrigeração e congelação.

Diante disto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da quercetina sobre o sêmen equino refrigerado e congelado e sua capacidade de conter a peroxidação lipídica e elevação nos níveis de EROs de células submetidas à situação de estresse.

2. Material e métodos

Todos os reagentes utilizados no estudo foram adquiridos da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO.

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 11/2014.

2.2. Animais, coleta e processamento do ejaculado

No estudo foi utilizado um total de 21 garanhões das raças Mangalarga Marchador, Crioulo, Quarto de Milha, Puro Sangue Inglês, Paint Horse, Brasileiro de Hipismo, Andaluz e Holsteiner, com idade variando entre 5 e 20 anos, localizados no município de Botucatu, Estado de São Paulo – Brasil (22°53'09'' S; 48°26'42'' O). Os garanhões foram mantidos em estábulos e recebiam feno de Tifton-85, ração e água *ad libitum*. As éguas foram mantidas em piquetes de 1200 m^2 mantendo quatro éguas por piquete, recebendo feno de Tifton-85, ração e *água ad libtum*.

A coleta do sêmen foi realizada utilizando vagina artificial (modelo Botupharma, Botucatu, SP, Brasil), e o ejaculado filtrado para retirada da fração gelatinosa. A concentração espermática foi determinada através de contagem de células na câmara de Neubauer, na proporção de 10µL sêmen para 190µL de água destilada.

2.3. Refrigeração do sêmen

As amostras submetidas à refrigeração foram diluídas em meio diluente à base de leite (Botu-Sêmen®, Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) adionado ou não de quercetina respeitado concentração fixa de 50 milhões ($50x10^6$) de espermatozoides totais por mililitro (mL), e submetidas à refrigeração a 5ºC, através do processo de refrigeração passiva em recipiente para transporte de sêmen (modelo Botu-Flex®, Botupharma, Botucatu, SP, Brasil), de acordo com metodologia utilizada por Hartwig et al. [2], permanecendo acondicionadas por 24 horas.

2.4. Congelação do sêmen

Após a determinação da concentração, as amostras destinadas à congelação foram processadas segundo a técnica descrita por Papa et al. [31], realizando diluição prévia do sêmen com meio a base de leite (Botu-Sêmen®, Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) na proporção de 1:1, centrifugadas a 600xG durante 10 minutos, o sobrenadante desprezado e o "pellet" ressuspendido em diluente de congelação (Botu-Crio®, Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) adicionado ou não de quercetina, na concentração de $200x10^6$ espermatozoides totais por mL, respeitando-se uma concentração total de espermatozoides $100x10^6$ por palheta de 0,5mL. Posteriormente, as amostras foram refrigeradas a 5°C por 20 minutos em refrigerador com temperatura controlada (Minitub do Brasil Ltda, Porto Alegre, RS, Brasil), em seguida, colocadas a seis centímetros acima do nível do nitrogênio líquido mantido em caixa de isopor, recebendo o vapor por 20

minutos, e subsequentemente submergidas no nitrogênio líquido e armazenadas em botijão.

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

2.5. Análises espermáticas

2.5.1. Cinética espermática

Foram avaliados os parâmetros de cinética espermática por meio do sistema computadorizado CASA - *Computer Assisted Sperm Analysis* (HTM-IVOS 12 Hamilton Thorne Research, Beverly, MA) mensurando cinco campos aleatórios. Para cada amostra foi avaliada motilidade espermática total (MT [%]), motilidade espermática progressiva (MP [%]) e percentual de espermatozoides com movimento rápido (RAP [%]). 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

2.5.2. Avaliação através da citometria de fluxo

A avaliação espermática por citometria de fluxo foi realizada através do 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. [32]. Assim, a uma amostra de 200µL de sêmen diluído em meio TALP-PVA, segundo Parrish et al. [33] 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 $5x10^6$ 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 37ºC.

A peroxidação lipídica (PER [%]) foi avaliada utilizando a sonda C11-BODYPY (D-3861; Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA), de acordo com Guasti et al. [34]. Uma amostra de 489,5µL de sêmen diluído em meio TALP-PVA a uma concentração de $2x10^6$ 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 37ºC. Após incubação, as amostras foram lavadas 2 vezes a 300*g*/5min e ressuspendidas para 500µL e analisadas por citometria de fluxo.

Para avaliação da concentração de EROs (CTEROS) foi utilizada a sonda 5- (-6) - carboxi-2,7-diclorodihidro-fluoresceindiacetato (carboxi-H2DCFDA; Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) de acordo com Guthrie e Welch [35], modificada por Papa et al. [36] pela adição de Hoechst 33342. Assim, em 489,5µL de sêmen diluído em TALP-PVA a uma concentração de $2x10^6$ 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 25ºC por 60 minutos ao abrigo da luz.

2.6. Experimento 1: Avaliação de diferentes concentrações de quercetina durante a refrigeração dos espermatozoides

Neste experimento utilizou-se quatro garanhões dois ejaculados de cada (n=8), visando determinar a melhor dose a ser utilizada nos experimentos subsequentes. Foi realizada a coleta e processamento do sêmen conforme descritos no item 2.2 e dividido em quatro tratamentos, Controle (Botu-Sêmen®), Q20 (20µg de quercetina/mL de Botu-Sêmen® - 66,18µM), Q30 (30µg de quercetina/mL de Botu-Sêmen® - 99,27µM) e Q45 (45µg de quercetina/mL de Botu-Sêmen® - 148,90µM) e refrigerados de acordo como descrito no item 2.3. As amostras foram avaliadas antes (T0) e após o processo de refrigeração (T24) à 5ºC, sendo a cinética espermática mensurada de acordo com a técnica descrita no item 2.5.1, e por se tratar de uma avaliação prévia, a análise de integridade da

membrana plasmática (IMP, %) foi realizada através das sondas fluorescentes iodeto de propidio (IP) e diacetato 6-carboxifluoresceína (DCA), de acordo com a técnica descrita por Harrison e Vickers [37], considerando-se intactos espermatozoides IP negativo e DCA positivo.

2.7. Experimento 2: Incorporação da quercetina ao meio de refrigeração para o sêmen equino

Após a determinação da concentração ótima de quercetina à ser utilizado no experimento 1, foram utilizados 42 ejaculados obtidos de 21 garanhões (n=42), coletados e manipulados conforme descrito no item 2.2, sendo divididos em dois tratamentos distintos, Controle (Botu-Sêmen®, Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) e Q20 (20µg de quercetina/mL de Botu-Sêmen® - 66,18µM). As amostras foram avaliadas no T0 e T24, e as análises de cinética espermática e citometria de fluxo foram executadas de acordo com as seções 2.5.1 e 2.5.2.

2.7.1. Ação da quercetina no ejaculado de garanhões considerados resistentes à refrigeração (RR) ou sensíveis à refrigeração (SR).

Do total de ejaculados obtidos no experimento 2, obteve-se dois ejaculados de seis garanhões (n=12) considerados resistentes à refrigeração (RR) e quatro garanhões, dois ejaculados de cada (n=8) classificados como sensíveis à refrigeração (SR). A classificação dos animais em RR ou SR foi determinada a partir de adaptação da divisão criada por Hartwig et al. [2], que leva em consideração a queda percentual de motilidade progressiva quando se compara as análises no momento da colheita (T0) e análises 24 horas depois (T24). Diante disto, aqueles animais que apresentaram decréscimo $\leq$ 10% de MP foram classificados como RR, enquanto os animais que apresentaram decréscimo $\geq$ 30% de MP foram classificados como SR.

As avaliações de cinética espermática e citometria de fluxo, foram realizadas conforme os itens seções 2.5.1 e 2.5.2, nos momentos T0 e T24.

2.8. Experimento 3: Incorporação da quercetina ao meio de congelação para o sêmen equino

Assim como no experimento 2, foram utilizados 42 ejaculados obtidos de 21 garanhões (n=42), coletados e manipulados conforme descrito no item 2.2, sendo divididos em alíquotas e congelados conforme item 2.4 em dois tratamentos distintos, Controle (Botu-Crio®, Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) e Q20c (20µg de quercetina/mL de Botu-Crio® - 66,18µM). As amostras foram avaliadas previamente à congelação (T0) e após a descongelação, onde as análises de cinética espermática e citometria de fluxo foram executadas de acordo com as seções 2.5.1 e 2.5.2.

2.8.1. Ação da quercetina no ejaculado de garanhões considerados resistentes à congelação (RC) ou sensíveis à congelação (SC)

Nesta avaliação, do total de ejaculados obtidos no experimento 3, foram separados dois ejaculados de cinco garanhões (n=10) considerados resistentes à congelação (RC) e nove garanhões, dois ejaculados de cada (n=18) classificados como sensíveis à refrigeração (SR). Esta classificação foi determinada a partir do decréscimo percentual de motilidade progressiva entre o ejaculado no momento da coleta (T0) e avaliação após descongelação, metodologia esta adaptada de Hartwig et al. [28]. Aqueles que apresentaram decréscimo ≤ 25% de MP foram considerados RC, já os animais que apresentaram percentual de perda ≥ 40% de MP, foram considerados SC. A manipulação das amostras foi realizada de acordo com a descrita no íten 2.2, dividindo-se duas alíquotas, Controle e Q20c.

2.9. Experimento 4: Impacto da utilização da quercetina no sêmen equino refrigerado, submetido à estresse e elevação nos níveis de EROs.

Para este experimento, foram utilizados 10 garanhões, um ejaculado de cada animal (n=10), processados conforme item 2.2, divididos em Controle (Botu-Sêmen®, Botupharma, Botucatu, SP, Brasil) e Q20 (20µg de quercetina/mL de Botu-Sêmen® - 66,18µM) e refrigerados como descrito no item 2.3. Após 24 horas de refrigeração, foi retirada uma amostra de 500µL de cada grupo experimental (Controle e Q20) e acrescido 50µM de ácido araquidônico por 15 minutos a 37ºC. Após esse período, as amostras foram lavadas duas vezes por centrifugação a 300xG por 5 minutos e o "pellet" diluído em TALP-PVA a uma concentração de $10x10^6$ espermatozoides/mL. Então, alíquotas de 500µL desta solução foram utilizadas para a avaliação da peroxidação lipídica (PER) e concentração de EROs (CTEROS) intracelular, conforme descrito previamente.

2.10. Análises estatísticas

Os resultados do experimento 1 foram avaliados através do programa computacional Programa GraphPad Prism versão 5.0 para Windows (GraphPad software, San Diego, USA). Para as análises laboratoriais das características espermáticas dos grupos estudados foi efetuada a análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey quando necessário.

Nos experimentos 2 e 3 os resultados obtidos foram analisados através do programa computacional SAS (SAS Institute Inc., Cary, USA), sendo primeiramente verificada a normalidade dos resíduos pelo Teste de Shapiro-Wilk (Proc-Univariate) e a homogeneidade das variâncias comparada pelo Teste Qui-Quadrado (Comando SPEC do Proc GLM). O efeito dos tratamentos (Controle e quercetina), ejaculado (todos os animais tiveram dois ejaculados coletados), além de suas interações, sobre as características de cinética, integridade estrutural e produção de radicais livres de oxigênio foram comparados através de modelo linear geral de análise de variância (Proc GLM), utilizando-se médias ajustadas através do comando "LS- means" dos SAS.

Para o experimento 4 foi avaliada a normalidade dos dados através do teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov, e utilizou-se teste "t" quando tinham distribuição normal e teste Mann Whitney para os resultados não paramétricos. As análises foram realizadas pelo Programa GraphPad Prism versão 5.0 para Windows (GraphPad software, San Diego, USA).

Para todas as avaliações diferenças foram consideradas quando $p<0,05$.

3. Resultados

3.1. Experimento 1

Os resultados obtidos no experimento 1 tanto para o sêmen fresco (T0) quanto pós refrigeração (T24) estão descritos nas tabelas 1 e 2 respectivamente. Foi possível observar que no tratamento Q45 (45µg de quercetina/mL de Botu-Sêmen® - 148,90µM) houve queda para os parâmetros de cinética espermática, tanto no momento T0 quanto no momento T24 em comparação aos demais tratamentos.

Tabela 1. Média ± desvio padrão dos parâmetros da cinética espermática e integridade de membrana dos tratamentos Controle (Botu-Sêmen®) e as diferentes concentrações de Quercetina (20µg/mL, 30µg/mL e 45µg/mL) avaliados pré-refrigeração (T0). MT: motilidade espermática total; MP: motilidade espermática progressiva; RAP: espermatozoides com movimento rápido; IM: Porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra.

	Controle	**Q20**	**Q30**	**Q45**
MT (%)	$87,1 \pm 5,1^{a}$	$86,3 \pm 4,5^{a}$	$84,6 \pm 4,2^{a}$	$59,2 \pm 36,7^{b}$
MP (%)	$36,5 \pm 7,5^{a}$	$39,5 \pm 7,2^{a}$	$41,8 \pm 4,4^{a}$	$26 \pm 18,5^{b}$
RAP (%)	$79,7 \pm 8,6^{a}$	$75 \pm 13,7^{a}$	$72,8 \pm 11,9^{a}$	$53,2 \pm 10,4^{b}$
IM (%)	$53,5 \pm 9,6^{a}$	$55,5 \pm 18,4^{a}$	$60,2 \pm 14,8^{a}$	$60 \pm 12,4^{a}$

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

Tabela 2. Média ± desvio padrão dos parâmetros da cinética espermática e integridade de membrana dos tratamentos Controle (Botu-Sêmen®) e as diferentes concentrações de Quercetina (20µg/mL, 30µg/mL e 45µg/mL) avaliados após 24h de refrigeração à 5ºC (T24). MT: motilidade espermática total; MP: motilidade espermática progressiva; RAP: espermatozoides com movimento rápido; IM: Porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra.

	Controle	**Q20**	**Q30**	**Q45**
MT (%)	$77,7 \pm 19,2^{a}$	$77,3 \pm 22,3^{a}$	$71,2 \pm 31,6^{a}$	$55,2 \pm 36,1^{b}$
MP (%)	$40,8 \pm 18,4^{a}$	$37 \pm 18,2^{a}$	$31,5 \pm 20,5^{ab}$	$22,6 \pm 19,2^{b}$
RAP (%)	$66,8 \pm 25,9^{a}$	$65,1 \pm 27,6^{a}$	$56,8 \pm 33,2^{ab}$	$42,1 \pm 10,6^{b}$
IM (%)	$42,1 \pm 12,4^{a}$	$43,1 \pm 14,1^{a}$	$44,5 \pm 15,4^{a}$	$42 \pm 10,7^{a}$

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

3.2. Experimento 2

Os resultados obtidos no experimento 2 estão apresentados nas tabelas 3 e 4. Não foi observada diferença significativa para os parâmetros de cinética espermática (tabela 3) e citometria de fluxo (tabela 4) ao se comparar o grupo Controle ao grupo tratado (Q20)

tanto no ejaculado fresco (T0) quanto após 24 horas de refrigeração (T24). Foi possível observar efeito do processo de refrigeração sobre os parâmetros de cinética espermática para ambos tratamentos (Controle e Q20).

Tabela 3. Médias ± desvio padrão da avaliação cinética nos tratamentos Controle (Botu-Sêmen®) e Q20 (20µg/mL) avaliados pré-refrigeração (T0) e após 24h de refrigeração à 5ºC (T24). MT: motilidade espermática total; MP: motilidade espermática progressiva; RAP: espermatozoides com movimento rápido.

	T0		**T24**	
	Controle	**Q20**	**Controle**	**Q20**
MT (%)	$80,1 \pm 10,3^{a}$	$79,1 \pm 10,2^{a}$	$69,1 \pm 16,8^{b}$	$68,6 \pm 16,3^{b}$
MP (%)	$38,1 \pm 9,7^{ab}$	$40,1 \pm 12,2^{a}$	$33,4 \pm 14,9^{bc}$	$32,5 \pm 14,2^{c}$
RAP (%)	$71,2 \pm 14,2^{a}$	$68,5 \pm 16,6^{a}$	$54,1 \pm 22,5^{b}$	$54,3 \pm 19,2^{b}$

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

Tabela 4. Médias ± desvio padrão das avaliações de citometria de fluxo para os tratamentos Controle (Botu-Sêmen®) e Q20 (20µg/mL) analisados pré-refrigeração (T0) e após 24h de refrigeração à 5ºC (T24). (MPAI, %) membrana plasmática e acrossomal íntegra; (PER, %) Peroxidação lipídica; (CTROS) Produção de ROS em relação ao total de células.

	T0		**T24**	
	Controle	**Q20**	**Controle**	**Q20**
MPAI (%)	$68,1 \pm 8,1^{a}$	$69,2 \pm 8,3^{a}$	$63,2 \pm 12,9^{b}$	$66,4 \pm 12,4^{ab}$
PER (%)	$34,6 \pm 33,4^{a}$	$33,3 \pm 32,3^{a}$	$33,8 \pm 31,4^{a}$	$26,7 \pm 30,2^{a}$
CTROS	$20,9 \pm 27,4^{a}$	$15,6 \pm 20,2^{a}$	$17,1 \pm 26,1^{a}$	$15,2 \pm 19,3^{a}$

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

3.2.1. Ação da quercetina no ejaculado de garanhões considerados resistentes à refrigeração (RR) ou sensíveis à refrigeração (SR).

Tanto no momento T0 quanto no momento T24, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (Controle e Q20) considerando a cinética espermática (tabela 5) e citometria de fluxo (tabela 6). Houve diferença significativa para cinética espermática das amostras refrigeradas (T24) entre os garanhões resistentes à refrigeração (RR) e os sensíveis à refrigeração (SR) em ambos tratamentos (Controle e Q20). Foi possível observar também efeito do grupo (RR e SR) na concentração de EROs (CTEROS) pós refrigeração.

Tabela 5. Médias ± desvio padrão da cinética espermática dos tratamentos Controle (Botu-Sêmen®) e Q20 (20µg/mL), pré-refrigeração (T0) e após 24h de refrigeração à 5ºC (T24), agrupados em RR (decréscimo na MP ≤ 10%) e SR (decréscimo na MP ≥ 30%). MT: motilidade espermática total; MP: motilidade espermática progressiva; RAP: espermatozoides com movimento rápido.

	T0		**T24**	
	Controle	**Q20**	**Controle**	**Q20**
MT (%)				
RR	$80,1 \pm 13,9^{aA}$	$80,5 \pm 12,3^{aA}$	$80,5 \pm 7,1^{aA}$	$74,1 \pm 9,6^{aA}$
SR	$76,1 \pm 7,9^{aA}$	$73,6 \pm 12,7^{aA}$	$53,6 \pm 17,3^{bB}$	$57,8 \pm 18,2^{bB}$

MP (%)				
RR	34,1 ± 10,1^{bA}	39,5 ± 13,3^{abA}	44,6 ± 8,1^{aA}	40,7 ± 11,7^{abA}
SR	41,3 ± 5,9^{aA}	39 ± 15,1^{aA}	18,8 ± 7,8^{bB}	22,7 ± 9,1^{bB}
RAP (%)				
RR	73,1 ± 16,4^{aA}	72 ± 13,6^{aA}	72,4 ± 12,1^{aA}	62,6 ± 10,9^{aA}
SR	66,5 ± 14,1^{aA}	60,8 ± 23,8^{aA}	32,6 ± 18,1^{bB}	40,6 ± 18,9^{bB}

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

**Valores com sobrescritos diferentes (A, B) na mesma coluna, para cada parâmetro avaliado, diferem significativamente ($p < 0,05$)

Tabela 6. Médias ± desvio padrão das avaliações de citometria de fluxo dos tratamentos Controle (Botu-Sêmen®) e Q20 (20µg/mL), pré-refrigeração (T0) e após 24h de refrigeração à 5ºC (T24), agrupados em RR (decréscimo na MP ≤ 10%) e SR (decréscimo na MP ≥ 30%). (MPAI, %) membrana plasmática e acrossomal íntegra; (PER, %) Peroxidação lipídica; (CTROS) Produção de ROS em relação ao total de células.

	T0		**T24**	
	Controle	**Q20**	**Controle**	**Q20**
MPAI (%)				
RR	68,7 ± 9,2^{abA}	71,3 ± 9,8^{aA}	60,8 ± 15,4^{bA}	68,9 ± 9,1^{abA}
SR	66,2 ± 6,8^{aA}	66,2 ± 8,1^{aA}	55,3 ± 11,1^{bA}	59,7 ± 13,1^{abA}
PER (%)				
RR	50,1 ± 37,6^{aA}	48,1 ± 35,6^{aA}	34,1 ± 31,5^{aA}	33,2 ± 33,5^{aA}
SR	24,1 ± 29,4^{aA}	31,1 ± 34,4^{aA}	35,3 ± 34,8^{aA}	31,6 ± 33,7^{aA}
CTROS				
RR	27,3 ± 32,3^{aA}	22,5 ± 27,6^{aA}	32,3 ± 35,2^{aA}	21,3 ± 16,9^{aA}
SR	13,6 ± 16,4^{aA}	11,9 ± 13,5^{aA}	3,1 ± 2,6^{bB}	2,2 ± 1,7^{bB}

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

**Valores com sobrescritos diferentes (A, B) na mesma coluna, para cada parâmetro avaliado, diferem significativamente ($p < 0,05$)

3.3. Experimento 3

Não se observou interferência do tratamento com quercetina nos parâmetros de cinética espermática tanto à fresco (T0) quanto descongelados (tabelas 7 e 8). Nas avaliações pela citometria de fluxo o tratamento Q20c não imprimiu alteração no momento T0 (tabela 9) entretanto resultou em menores taxas de peroxidação lipídica (PER) e concentração de EROs (CTEROS) nas amostras descongeladas quando comparadas ao tratamento Controle (tabela 10).

Tabela 7. Médias ± desvio padrão da cinética espermática dos tratamentos Controle (Botu-Crio®) e Q20c (20µg/mL) avaliados pré-congelação (T0). MT: motilidade espermática total; MP: motilidade espermática progressiva; RAP: espermatozoides com movimento rápido.

	T0	
	Controle	**Q20c**
MT (%)	80,1 ± 10,3^{a}	79,1 ± 10,2^{a}
MP (%)	38,1 ± 9,7^{a}	40,1 ± 12,2^{a}

RAP (%)	71,1 ± 14,2[a]	68,5 ± 16,6[a]

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

Tabela 8. Médias ± desvio padrão da cinética espermática dos tratamentos Controle (Botu-Crio®) e Q20c (20µg/mL) avaliados descongelados. MT: motilidade espermática total; MP: motilidade espermática progressiva; RAP: espermatozoides com movimento rápido.

	Descongelado	
	Controle	**Q20c**
MT (%)	51,1 ± 17,7[a]	52,3 ± 20,1[a]
MP (%)	22,7 ± 11,6[a]	24,1 ± 11,9[a]
RAP (%)	35,1 ± 17,5[a]	37,6 ± 19,3[a]

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

Tabela 9. Médias ± desvio padrão das avaliações de citometria de fluxo para os tratamentos Controle (Botu-Crio®) e Q20c (20µg/mL) avaliados pré-congelação (T0). (MPAI, %) membrana plasmática e acrossomal íntegra; (PER, %) Peroxidação lipídica; (CTROS) Produção de ROS em relação ao total de células.

	T0	
	Controle	**Q20c**
MPAI (%)	68,1 ± 8,1[a]	69,2 ± 8,3[a]
PER (%)	34,6 ± 33,4[a]	33,3 ± 32,3[a]
CTROS	20,9 ± 27,4[a]	15,6 ± 20,2[a]

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

Tabela 10. Médias ± desvio padrão das avaliações de citometria de fluxo para os tratamentos Controle (Botu-Crio®) e Q20c (20µg/mL) avaliados descongelados. (MPAI, %) membrana plasmática e acrossomal íntegra; (PER, %) Peroxidação lipídica; (CTROS) Produção de ROS em relação ao total de células.

	Descongelado	
	BC	**Q20c**
MPAI (%)	20,8 ± 8,6[a]	18,4 ± 8,6[a]
PER (%)	42,1 ± 23,8[a]	30,1 ± 23,5[b]
CTROS	11,1 ± 19,1[a]	2,7 ± 3,2[b]

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

3.3.1. Ação da quercetina no ejaculado de garanhões considerados resistentes à congelação (RC) ou sensíveis à congelação (SC)

Os resultados obtidos neste experimento estão exibidos nas tabelas 11, 12, 13 e 14. Não houve diferença estatística entre os tratamentos (Controle e Q20c) para os parâmetros de cinética espermática tanto no momento T0 quanto para as amostras descongeladas. Foi possível observar diferença entre os grupos (RC e SC) para as avaliações de cinética tanto à fresco quanto pós descongelação para ambos tratamentos (Controle e Q20c). O tratamento Q20c apresentou menores taxas de peroxidação lipídica (PER) e concentração de EROs (CTEROS) quando comparado ao Controle para o grupo de garanhões sensíveis

à congelação (SC), fato não observado no grupo de garanhões resistentes à congelação (RC).

Tabela 11. Médias ± desvio padrão de cinética espermática dos tratamentos Controle (Botu-Crio®) e Q20c (20µg/mL), pré-congelação (T0), agrupados em RC (decréscimo na MP ≤ 25%) e SC (decréscimo na MP ≥ 40%). MT: motilidade espermática total; MP: motilidade espermática progressiva; RAP: espermatozoides com movimento rápido.

	T0	
	Controle	**Q20c**
MT (%)		
RC	$88,2 \pm 6,4^{aA}$	$87 \pm 7,1^{aA}$
SC	$74,7 \pm 10,7^{aB}$	$74,6 \pm 11,2^{aB}$
MP (%)		
RC	$39,6 \pm 4,9^{aA}$	$45,8 \pm 7,6^{aA}$
SC	$35,2 \pm 9,6^{aA}$	$35,1 \pm 12,3^{aB}$
RAP (%)		
RC	$82,4 \pm 6,1^{aA}$	$79,5 \pm 7,1^{aA}$
SC	$65,3 \pm 13,4^{aB}$	$63,6 \pm 17,9^{aB}$

*Valores com sobrescritos diferentes (a, b) na mesma linha diferem significativamente ($p < 0,05$)
**Valores com sobrescritos diferentes (A, B) na mesma coluna, para cada parâmetro avaliado, diferem significativamente ($p < 0,05$)

Tabela 12. Médias ± desvio padrão de cinética espermática dos tratamentos Controle (Botu-Crio®) e Q20c (20µg/mL), descongelados, agrupados em RC (decréscimo na MP ≤ 25%) e SC (decréscimo na MP ≥ 40%). MT: motilidade espermática total; MP: motilidade espermática progressiva; RAP: espermatozoides com movimento rápido.

	Descongelado	
	Controle	**Q20c**
MT (%)		
RC	$69,6 \pm 5,1^{aA}$	$70,2 \pm 4,5^{aA}$
SC	$37,8 \pm 14,9^{aB}$	$39,8 \pm 18,8^{aB}$
MP (%)		
RC	$34,9 \pm 5,1^{aA}$	$36,2 \pm 5,6^{aA}$
SC	$13,5 \pm 6,1^{aB}$	$15,1 \pm 7,5^{aB}$
RAP (%)		
RC	$53 \pm 8,1^{aA}$	$56,6 \pm 4,8^{aA}$
SC	$22,2 \pm 12,7^{aB}$	$23,8 \pm 13,5^{aB}$

*Valores com sobrescritos diferentes (a, b) na mesma linha diferem significativamente ($p < 0,05$)
**Valores com sobrescritos diferentes (A, B) na mesma coluna, para cada parâmetro avaliado, diferem significativamente ($p < 0,05$)

Tabela 13. Médias ± desvio padrão das avaliações de citometria de fluxo para os tratamentos Controle (Botu-Crio®) e Q20c (20µg/mL), pré-congelação (T0), agrupados em RC (decréscimo na MP ≤ 25%) e SC (decréscimo na MP ≥ 40%). (MPAI, %) membrana plasmática e acrossomal íntegra; (PER, %) Peroxidação lipídica; (CTROS) Produção de ROS em relação ao total de células.

	T0	
	Controle	**Q20c**

MPAI (%)		
RC	$70,3 \pm 7,1^{aA}$	$72,1 \pm 7,4^{aA}$
SC	$66,5 \pm 8,4^{aA}$	$67,2 \pm 9,2^{aA}$
PER (%)		
RC	$30,8 \pm 32,5^{aA}$	$37,7 \pm 35,2^{aA}$
SC	$34,3 \pm 36,1^{aA}$	$31,1 \pm 34,3^{aA}$
CTROS		
RC	$11,1 \pm 14,1^{aA}$	$7,8 \pm 6,6^{aA}$
SC	$23,8 \pm 29,1^{aA}$	$17,9 \pm 24,6^{aA}$

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

**Valores com sobrescritos diferentes (A, B) na mesma coluna, para cada parâmetro avaliado, diferem significativamente ($p < 0,05$)

Tabela 14. Médias ± desvio padrão das avaliações de citometria de fluxo para os tratamentos Controle (Botu-Crio®) e Q20c (20µg/mL), descongelados, agrupados em RC (decréscimo na MP ≤ 25%) e SC (decréscimo na MP ≥ 40%). (MPAI, %) membrana plasmática e acrossomal íntegra; (PER, %) Peroxidação lipídica; (CTROS) Produção de ROS em relação ao total de células.

	Descongelado	
	BC	**Q20c**
MPAI (%)		
RC	$19,5 \pm 7,2^{aA}$	$17,5 \pm 9,4^{aA}$
SC	$20,2 \pm 8,8^{aA}$	$17,2 \pm 8,3^{aA}$
PER (%)		
RC	$45,4 \pm 15,3^{aA}$	$44,4 \pm 22,9^{aA}$
SC	$52,1 \pm 23,9^{aA}$	$32,9 \pm 21,9^{bA}$
CTROS		
RC	$10,3 \pm 18,1^{aA}$	$2,9 \pm 2,3^{aA}$
SC	$12,2 \pm 19,6^{aA}$	$1,8 \pm 1,5^{bA}$

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

**Valores com sobrescritos diferentes (A, B) na mesma coluna, para cada parâmetro avaliado, diferem significativamente ($p < 0,05$)

3.4. Experimento 4

Os resultados obtidos no experimento 4 estão apresentados na tabela 15. Na avaliação prévia à inclusão do ácido aracdônico (PRÉ) o tratamento Q20 já resultou em redução na concentração de EROs (CTEROS) quando comparado ao tratamento Controle. No momento PÓS possível observar além da queda na CTEROS, uma redução significativa na taxa de peroxidação lipídica (PER) entre os tratamentos.

Tabela 15. Médias ± desvio padrão das avaliações de citometria de fluxo para os tratamentos Controle (Botu-Sêmen®) e Q20 (20µg/mL), refrigerados, e avaliados antes (PRÉ) e após a inclusão do ácido aracdônico (PÓS). (PER, %) Peroxidação lipídica; (CTEROS) Produção de EROs em relação ao total de células.

	PRÉ		**PÓS**	
	Controle	**Q20**	**Controle**	**Q20**

PER (%)	22,1 ± 16,5[a]	18,1 ± 16,1[a]	61,8 ± 25,6[a]	25,8 ± 22,7[b]
CTEROS	33,6 ± 26,1[a]	13,1 ± 12,6[b]	76,5 ± 28,1[a]	29,3 ± 35,4[b]

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

4. Discussão

O estresse oxidativo resultante da elevação nos níveis de EROs é relatado como uma importante causa de queda na viabilidade celular durante a criopreservação espermática [38]. A quercetina é considerada um potente antioxidante devido ao grande número de hidroxilas (OH) presentes em sua estrutura, tornando-a capaz de estabilizar os radicais superóxido (O_2^-) e hidroxil ($OH^\bullet$), assim como de interromper o desenvolvimento da peroxidação lipídica [4,25,27,39].

Diante da variabilidade de concentrações de quercetina utilizadas no ejaculado nas diferentes espécies referenciadas na literatura, o presente estudo, no experimento 1, avaliou o efeito da adição de 20, 30 e 45 µg de quercetina/mL de Botu-Sêmen® (66,18µM, 99,27µM e 148,90µM) durante a refrigeração espermática na concentração de $50x10^6$ espermatozoides/mL de diluente. Embora não haja diferença significante para a IM entre os tratamentos independente do momento (T0 e T24), foi observado que houve uma tendência à queda na cinética espermática a medida que se elevou a concentração de quercetina no tratamento, constatando que na concentração de 45µg/mL resultou em queda significativa para MT, MP e RAP tanto no momento T0 quanto T24.

Corroborando com os achados de Johinke, et al. [40], que avaliando a adição de diferentes concentrações de quercetina ao ejaculado de coelhos durante a refrigeração, observaram que a incorporação de 25µM e 50µM do antioxidante não influenciou na cinética espermática, já concentrações elevadas de quercetina (100µM e 200µM) resultaram em menores índices de MT após 48 horas de refrigeração à 15˚C. Assim como no presente estudo não foi observada interferência sobre a IM, independente da concentração adicionada.

Em contrapartida, resultados obtidos por Mcniven e Richardson [41], sugerem que a incorporação de 100µM de quercetina ao sêmen equino refrigerado à 5˚C por 48 horas, resulte em melhores parâmetros de cinética espermática e integridade das membranas.

A redução na motilidade espermática observada ao se elevar a concentração de quercetina no meio pode ser atribuída ao efeito inibitório que o antioxidante imprime sobre a enzima Ca^{2+} ATPase, responsável por controlar a motilidade dos espermatozoides, uma vez que a queda nos níveis desta enzima leva ao acúmulo de Ca^{2+} nas células bloqueando a capacidade das células se movimentarem, o que justifica a redução nos parâmetros de cinética sem que tenha ocorrido interferência na integridade das membranas [42].

Além disto, embora ainda não se tenha estabelecido a concentração ótima de quercetina a ser utilizada no ejaculado de equinos, de acordo com Spencer, et al. [43], em avaliação do efeito deste antioxidante sobre fibroblastos foi observado que baixas

concentrações resultaram em redução do estresse oxidativo enquanto que concentrações elevadas causaram efeitos citotóxicos.

Portanto, por não apresentar impacto negativo sobre a cinética espermática e integridade das membranas ao se comparar ao grupo controle, optou-se por utilizar a concentração de 20µg de quercetina/mL de Botu-Sêmen® (66,18µM) nos experimentos subsequentes.

Assim como no experimento anterior, no experimento 2 não houve benefício sobre a cinética espermática (MT, MP e RAP) ao se adicionar quercetina (20µg/mL) ao sêmen refrigerado de garanhões a 5˚C por 24 horas. Independente do tratamento realizado (Controle ou Q20), foi possível observar queda significativa para MT e RAP, ao se comparar os momentos T0 e T24, de acordo com Schoeber, et al. [44], o processo de criopreservação promove danos à mitocôndria resultando em elevação nos níveis de EROs e comprometendo a síntese de ATP por parte desta organela, o que leva a redução na motilidade espermática, apesar disto a inclusão da quercetina no meio não resultou em melhores resultados de cinética.

O tratamento Controle foi capaz de manter a MP ao se comparar os momentos T0 e T24, ($38,16 \pm 9,72^{ab}$ vs. $33,45 \pm 14,95^{bc}$) fato não observado para o tratamento Q20 ($40,11 \pm 12,27^{a}$ vs. $32,54 \pm 14,27^{c}$), sugerindo uma sutil interferência do antioxidante sobre a enzima Ca^{2+} ATPase no sêmen equino refrigerado, embora não tenha refletido sobre a MT e RAP [42].

Agentes antioxidantes enzimáticos como a superóxido dismutase [45], catalase [46] e glutationa peroxidase [47] são comumente encontrados nos espermatozoides e no plasma seminal dos animais domésticos. De acordo com Kankofer, et al. [15], esta linha de defesa primária é suficiente para conter o estresse oxidativo causado pelo processo de refrigeração do sêmen equino a 5˚C durante 24 horas, prescindindo da adição de antioxidantes exógenos. No presente estudo, a adição de quercetina não resultou em redução nos níveis de EROs após 24 horas de refrigeração, consequentemente não havendo interferência sobre a peroxidação lipídica.

Nas avaliações da citometria de fluxo, embora não exista diferença significativa entre os tratamentos (Controle e Q20) após a refrigeração, ao se comparar a MPAI nos momentos (T0 vs. T24) dentro de cada tratamento Controle ($68,08 \pm 8,18^{a}$ vs. $63,18 \pm 12,92^{b}$) e Q20 ($69,27 \pm 8,37^{a}$ vs. $66,49 \pm 12,39^{ab}$), é possível notar que a tratamento com quercetina promoveu manutenção mesmo após 24 horas de refrigeração ($p < 0,05$). Para Ortega-Ferrosola, et al. [12], o processo de peroxidação lipídica é um dos principais causadores de lesão irreversível às membranas celulares, apesar disto no presente estudo, a quercetina foi capaz de manter a integridade das membranas pós refrigeração sem que interferisse no estresse oxidativo, propondo que este antioxidante possua um mecanismo ainda desconhecido de ação sobre a proteção das membranas celulares.

De acordo com Aurich [1], um dos fatores preponderantes para o sucesso na utilização da refrigeração do sêmen equino é a capacidade individual de resistir ao processo de criopreservação. Maior ocorrência de lesão às mitocôndrias dos espermatozoides é considerada uma das causas para que determinados indivíduos sejam mais sensíveis ao processo, resultando em queda na motilidade e estresse oxidativo [44]. Diante disto Hartwig, et al. [2], classificaram em seu experimento os garanhões em “good

coolers" ou "bad coolers", levando em consideração a motilidade progressiva como indicativo de capacidade de resistir ao processo de refrigeração.

No experimento 2, item 2.7.1, a adição de quercetina não resultou em benefícios para a cinética espermática tanto em garanhões considerados resistentes à refrigeração (RR) assim como para os garanhões sensíveis à refrigeração (SR). À avaliação de MPAI, não houve diferença significativa entre os tratamentos após a refrigeração, porém ao se avaliar os diferentes momentos (T0 vs. T24) nos tratamentos Controle ($66,2 \pm 6,81^{a}$ vs. $55,37 \pm 11,13^{b}$) e Q20 ($66,26 \pm 8,17^{a}$ vs. $59,7 \pm 13,01^{ab}$) fica evidenciado que o efeito protetor de membrana da quercetina observado no experimento 2, ocorreu apenas para os indivíduos sensíveis à refrigeração.

Segundo Gibb, et al. [48], existe uma correlação positiva entre a motilidade espermática e produção de radicais livres, indicando que ejaculados com melhor cinética espermática resultam em maior atividade mitocondrial e metabólica, levando a maior produção de EROs. Corroborando com os achados do presente estudo, observando que após 24 horas de refrigeração à 5˚C, independente do tratamento avaliado, o grupo RR apresentou maior CTEROS quando comparado ao grupo SR, resultado que não imprimiu maiores índices de peroxidação lipídica, indicando que apesar de apresentarem maiores concentrações de EROs após a refrigeração, os indivíduos do grupo RR possuem mecanismos compensatórios que estabilizam estes radicais livres.

De acordo com estudos de Baumber, et al. [49], a ocorrência de estresse oxidativo no sêmen equino é melhor indicada através de variação nos parâmetros de motilidade espermática do que ao avaliar a viabilidade, integridade acrossomal e peroxidação lipídica. Apesar disto, no experimento 3, não se observou diferença significativa entre os tratamentos para cinética espermática ainda que tenha se evidenciado redução na CTEROS e PER para o grupo tratado (Q20c).

Em estudo com sêmen congelado de ovinos Silva, et al. [4], também não encontraram benefícios na cinética espermática ao adicionar 20 µg/mL de quercetina ao diluente, sugerindo que o antioxidante, nestas concentrações, não tenha influência significativa sobre a cinética espermática na avaliação imediatamente após descongelação.

Diferentemente dos resultados encontrados no presente estudo para sêmen refrigerado, a adição de 20µg de quercetina/mL (66,18µM) ao diluente de congelação Botu-Crio® resultou em redução significativa nos níveis de EROs e peroxidação lipídica após descongelação, minimizando o estresse oxidativo sofrido pelas células.

Para Carvalho, et al.[50], a maior parte dos antioxidantes endógenos se encontram no meio intracelular, mas durante o período de maturação o espermatozoide perde grande parte do seu citoplasma e junto com ele quantidade relevante destes antioxidantes. Diante disto, o plasma seminal assume um papel importante, sendo fonte de antioxidantes para as células espermáticas [51,52]. Porém, durante a congelação do sêmen equino é realizada a remoção do plasma seminal, expondo os espermatozoides a elevação nos níveis de EROs e ocorrência de peroxidação lipídica, havendo maior dependência da adição de antioxidantes exógenos [11,53].

Observou-se com o experimento 3, item 2.8.1, que apenas os indivíduos considerados sensíveis à congelação (SC) se beneficiaram com a inclusão da quercetina

ao meio, havendo diferenças significativas entre os tratamentos Controle e Q20c para os parâmetros de CTEROS e PER após a descongelação.

Esta diferença de resposta ao tratamento entre os grupos estudados sugere que os espermatozoides de garanhões resistentes à congelação (RC) possuam mecanismos antioxidantes próprios suficientes para conter a elevação das EROs e peroxidação lipídica durante a criopreservação, fato não observado para os indivíduos sensíveis à congelação, visto que estes foram mais dependentes da inclusão da quercetina no meio.

As células espermáticas dos animais domésticos contêm em sua membrana uma concentração elevada de ácidos graxos polinsaturados, embora isto garanta maior fluidez e flexibilidade à membrana do espermatozoide, também a torna mais susceptível à ação deletéria dos radicais livres [54-56]. De acordo com Garcia, et al. [57], espermatozoides de garanhões que possuem uma maior quantidade de ácidos graxos polinsaturados na sua estrutura celular, são mais susceptíveis a ocorrência de peroxidação lipídica resultante do estresse oxidativo após processo de criopreservação, havendo uma importância maior na inclusão de antioxidantes exógenos para estes indivíduos.

A inclusão da quercetina, no experimento 4, foi capaz de conter os danos oxidativos dos espermatozoides refrigerados e submetidos à estresse térmico e químico. No momento PRÉ, em que as amostras foram mantidas por 15 minutos a 37˚C, o tratamento com 20µg de quercetina/mL de Botu-Sêmen® (66,18µM), foi capaz de controlar a elevação nos níveis de EROs, apesar de não interferir sobre a PER, sugerindo que nesta situação os antioxidantes já presentes no plasma seminal foram suficientes para conter a lipoperoxidação no tratamento Controle [15].

Já no momento PÓS, quando além do estresse térmico, as amostras foram submetidas à estresse químico resultante da inclusão do ácido aracdônico no meio, o tratamento Q20 conteve significativamente os níveis de EROs e esta diferença refletiu em menor peroxidação lipídica, indicando a importância da inclusão de quercetina ao meio quando as células espermátcas são submetidas a uma situação de estresse excessivo.

Corroborando com os achados de Johinke, et al. [40], que não observaram diferença significativa ao avaliar o sêmen de coelhos refrigerado a 15˚C por 24 horas na presença de quercetina, já quando mantidos por 48, 70 e até mesmo 96 horas, o grupo tratado com quercetina apresentou menores concentrações de H_2O_2, entretanto só com 96 horas de refrigeração, quando houve maior estresse oxidativo para as células, o tratamento com quercetina resultou em menores taxas de peroxidação lipídica.

5. Conclusão

Embora a adição de 20µg de quercetina/mL (66,18µM) durante a refrigeração do sêmen equino a 5˚C por 24 horas não tenha influenciado os parâmetros de cinética espermática ou mesmo amenizado o estresse oxidativo, ao se adicionar mesma concentração para o sêmen congelado o antioxidante reduziu a concentração de EROs e ocorrência de peroxidação lipídica, principalmente para os garanhões considerados sensíveis ao processo congelação. Além disto a inclusão da quercetina ao diluente permitiu às células espermáticas maior resistência aos danos oxidativos quando estas

foram submetidas a uma situação de elevado estresse. Em virtude da variedade de resultados conflitantes encontrados na literatura sobre a eficiência da quercetina no ejaculado dos animais domésticos, em especial dos equinos, são necessários mais estudos acerca do assunto.

Referências

[1] Aurich C. Recent advances in cooled-semen technology. Animal Reproduction Science, v.107, p.268-75, 2008.
[2] Hartwig FP, Lisboa FP, Hartwig FP, Monteiro GA, Maziero RR, Freitas-Dell'aqua CP, Alvarenga MA, Papa FO, Dell'aqua Jr, JA. Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: an alternative for bad cooler stallions. Theriogenology, v.81, p.340-346, 2014.
[3] Oliveira GC, Oliveira BMM, Caleghini ECC, Fernandes CB, Mattos CB. Criopreservação do semen equino: uma revisão. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.37, p.23-28, 2013.
[4] Silva ECB, Guerra MMP. Terapias antioxidants na criopreservação espermática. Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias, v.107, p.143-149, 2012.
[5] De lamirande E, Gagnon C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. Free Radical Biology and Medicine, v.14, p.157-166, 1993.
[6] Leclerc P, De Lamirande E, Gagnon C. Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. Free Radical Biology and Medicine, v.22, p.643-656, 1997.
[7] Gadella BM, Rathi R, Brouwers JF, Stout TA. Colenbrander, B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. Animal Reproduction Science, v.68, p.249-265, 2001.
[8] Naz RK, Rajesh PB. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction. Reproductive Biology and Endocrinology, v.2, p.1-12, 2004.
[9] Maia MS, Bicudo SD. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.33, p.183-193, 2009.
[10] Alvarez JG, Storey BT. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. Journal of Andrology, v.13, p.232-241, 1992.
[11] Lenzi A, Gandini L, Picardo M, Tramer F, Sandri G, Panfili E. Lipoperoxidation damage of spermatozoa polyunsaturated fatty acids (PUFA): scavenger mechanisms and possible scavenger therapies. Frontiers in Bioscience, v.5, p.1-15, 2000.
[12] Ortega- Ferrusola C, Gonzalez FL, Morrell JM, Salazar SC, Macías-García 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, v.138, p.55-63, 2009.
[13] Betancur GR, López EP, Rojano BA. Estrés oxidativo en el semen equino criopreservado. Revista Lasallista de Investigación, v.9, p.128-136, 2012.

[14] Maxwell WM, Stojanov T. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. Reproduction, Fertility and Development, v.8, p.1013-1020, 1996.
[15] Kankofer M, Kolm G, Aurich J, Aurich C. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5°C. Theriogenology, v.63, p.1354-1365, 2005.
[16] Perumal P. Effect of superoxide dismutase on semen parameters and antioxidant enzyme activities of liquid stored (5°c) Mithun (bos frontalis) semen. Journal of Animals, v.2014, p.1-9, 2014.
[17] Camara DR, Silva SV, Almeida FC, Nunes JF, Guerra MMP. Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen. Theriogenology, v.76, p.342-350, 2011.
[18] Oliveira RA, Wolf CA, Viu MAO, Gambarini ML. Addition of glutathione to an extender for frozen equine semen. Journal of Equine Veterinary Science, v.33, p.1148-1152, 2013.
[19] Barros LO, Silva SV, Almeida FC, Silva ECB, Carneiro GF, Guerra MMP. Efeito da adição de glutationa peroxidase e cisteína ao diluidor de congelação no sêmen equino. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v.65, p.430-438, 2013.
[20] Aurich JE, Schönherr U, Hoppe H, Aurich C. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. Theriogenology, v.48, p.185-192, 1997.
[21] 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, v.56, p.577-589, 2001.
[22] Michael AJ, Alexopoulos C, Pontiki EA, Hadjipavlou-Litina DJ, Saratsis P, Ververidis HN, Boscos CM. Effect of antioxidant supplementation in semen extenders on semen quality and reactive oxygen species of chilled canine spermatozoa. Animal Reproduction Science, v.112, p.119-135, 2009.
[23] Michael AJ, Alexopoulos C, Pontiki EA, Hadjipavlou-Litina DJ, Saratsis P, Ververidis HN, Boscos CM. Quality and reactive oxygen species of extended canine semen after vitamin C supplementation. Theriogenology, v.70, p.827-835, 2008.
[24] Husain SR, Cillard J, Cillard P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. Phytochemistry, v.26, p.2489-2491, 1987.
[25] Chen Y, Zheng R, Jia Z, Ju Y. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. Free Radical Biology and Medicine, v.9, p.19-21, 1990.
[26] Afanas'ev IB, Dorozhko AI, Brodskii AV, Kostyuk VA, Potapovitch AI. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. Biochemical Pharmacology, v.38, p.1763-1769, 1989.
[27] Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. Química Nova, v.29, p.113-123, 2006.
[28] Aherne SA, O'brien NM. Mechanism of protection by the flavonoids, quercetin and rutin, against tert-butylhydroperoxide- and menadioneinduced DNA single strand breaksin Caco-2 cells. Free Radical Biology and Medicine, v.29, p.507-514, 2000.
[29] Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration. Where are we now? Journal of Neurochemistry, v. 97, p. 1634-1658, 2006.

[30] Gülçin I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. Archives of Toxicology, v.86, p.345-391, 2012.
[31] Papa FO, Melo CM, Fioratti EG, Dell'aqua Jr JA, Zahn FS, Alvarenga MA. Freezing of stallion epididymal sperm. Animal Reproduction Science, v.107, p.293–301, 2008.
[32] 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, v.9, p.941, 2012.
[33] Parrish JJ, Susko-Parrish J, Winer MA, First NL. Capacitation of bovine sperm by heparin. Biology of Reproduction, v.38, p.1171-1180, 1988.
[34] 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, v. 25, p.20-20, 2012.
[35] 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, v.84, p.2089-2100, 2006.
[36] Papa PM, Maziero RRD, Guasti PN, Junqueira CR, Freitas-Dell'aqua CP, Papa FO, Vianna FP, Alvarenga MA, Crespilho AM, Dell'aqua JA. Effect of glycerol on the viability and fertility of cooled bovine semen. Theriogenology, v.83, p.107-113, 2015.
[37] Harrison RA, Vickers SE. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. Journal of Reproduction and Fertility, v.88, p.343-452, 1990.
[38] Watson PF. The cause of reduced fertility with cryopreserved semen. Animal Reproduction Science, v.60, p.481-492, 2000.
[39] Wright JS, Johnson ER, Dilabio GA. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. Journal of the American Chemical Society, v.123, p.1173-1183, 2001.
[40] Johinke D, De Graaf SP, Bathgate R. Quercetin reduces the in vitro production of H2O2 during chilled storage of rabbit spermatozoa. Animal Reproduction Science, v.151, p.208-219, 2014.
[41] Mcniven MA, Richardson GF. Chilled storage of stallion semen using perfluorochemicals and antioxidants. Cell Preservation Technology, v.1, p.165-174, 2003.
[42] Khanduja KL, Verma A, Bhardwaj A. Impairment of human sperm motility and viability by quercetin is independent of lipid peroxidation. Andrologia, v.33, p.277-281, 2001.
[43] Spencer JPE, Kuhnle GGC, Williams RJ, Rice-Evans C. Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its in vivo metabolites. Biochemical Journal, v. 372, p. 173-181, 2003.
[44] Schober D, Aurich C, Nohl H, Gille L. Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine spermatozoa. Theriogenology, v.68, p.745-754, 2007

[45] Mruk DD, Silvestrini B, Mo M, Cheng CY. Antioxidant superoxide dismutase - a review: its function, regulation in the testis and role in male fertility. Contraception, v.65, p.305-11, 2002.
[46] Ball BA, Gravance CG, Medina V, Baumber J, Liu IKM. Catalase activity in equine semen. American Journal of Veterinary Research, v.61, p.1026-1030, 2000.
[47] Venditti P, Di Stefano L, Di Meo S. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. Mitochondrion, v.13, p.71-82, 2013.
[48] Gibb Z, Lambourne SR, Aitken R. The paradoxical relationship btween stallion fertility and oxidative stress. Biology of Reproduction, v.91, p.1-10, 2014.
[49] Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies-Morel MC. 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.
[50] Carvalho OF, Ferreira JDJ, Silveira NA, Freneau GE. Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v.38, p.33-38, 2002.
[51] Agarwal A, Saleh RA. Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. Urologic Clinics of North America, v.29, p.817-827, 2002.
[52] Sikka SC. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. Journal of Andrology, v.25, p.5-18, 2004.
[53] Safarinejad MR, Hosseini SY, Dadkhah F, Asgari MA. Relationship of omega-3 and omega-6 fatty acids with semen characteristics, and anti-oxidant status of seminal plasma: A comparison between fertile and infertile men. Clinical Nutrition, v.29, p.100-105, 2010.
[54] Lenzi A, Gandini L, Lombardo F, Picardo M, Maresca V, Panfili E, Tramer F, Boitani C, Dondero F. Polyunsaturated fatty acids of germ cell membranes, glutathione and blutathione-dependent enzyme-PHGPx: from basic to clinic. Contraception, v.65, p.301-304, 2002.
[55] Godwin A, Prabhu HR. Lipid peroxidation of fish oils. Indian Journal of Clinical Biochemistry, v.21, p.202-204, 2006.
[56] Salmani H, Nabi MM, Vaseghi-Dodaran H, Rahman MB, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Shakeri M, Towhidi A, Shahneh AZ, Zhandi M. Effect of glutathione in soybean lecithin-based semen extender on goat semen quality after freeze-thawing. Small Ruminant Research, v.112, p.123-127, 2013.
[57] García BM, Fernández LG, Ferrusola CO, Rodríguez AM, Bolaños JMG, Martinez HR, Tapia JA, Morcuende D, Peña FJ. Fatty acids and plasmalogens of the phospholipids of the sperm membranes and their relation with the post-thaw quality of stallion spermatozoa. Theriogenology, v. 75, p. 811-818, 2011.