



UNIVERSIDADE DE CRUZ ALTA

Andressa Moneiro Gressler Stumm

ESTRESSE OXIDATIVO SANGUÍNEO E SEMINAL EM EQUINOS

Dissertação de Mestrado

Cruz Alta, 2016

Andressa Moneiro Gressler Stumm

ESTRESSE OXIDATIVO SANGUÍNEO E SEMINAL EM EQUINOS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Profissional em Desenvolvimento Rural da Universidade de Cruz Alta, como requisito à obtenção do Título de Mestre em Desenvolvimento Rural.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Carvalho Siqueira
Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a Patricia Wolkmer

Cruz Alta, Julho de 2016

Universidade de Cruz Alta- UNICRUZ
Programa de Mestrado Profissional em Desenvolvimento Rural

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

ESTRESSE OXIDATIVO SANGUÍNEO E SEMINAL EM EQUINOS

Elaborada por

Andressa Moneiro Gressler Stumm

Como requisito parcial para a obtenção do
Título de Mestre em Desenvolvimento Rural

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Lucas Carvalho Siqueira
(Orientador)

Prof. Dr. Lucas Carvalho Siqueira _____ UNICRUZ

Prof. Dr. Luis Fabiano Santos da Costa _____ UNIPAMPA

Prof. Dr. Ricardo Xavier da Rocha _____ UNICRUZ

Cruz Alta, 28 de junho de 2016.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas oportunidades e por colocar em meu caminho pessoas especiais que auxiliaram na produção desse trabalho.

Aos meus pais Glaicon e Ana e minha irmã Eduarda, obrigada pelo amor e pelo incentivo de sempre.

Ao meu esposo Paulo Henrique por todo amor, amizade, compreensão e motivação.

Um agradecimento especial aos professores Patrícia, Lucas e Luiz Felipe, professores fantásticos, empenhados com a pesquisa e o crescimento profissional de seus alunos.

Obrigada às meninas do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Unicruz: Jamile, Bibiana e Marilian pela atenção e pela ajuda na execução do projeto.

Agradeço a Unicruz por disponibilizar laboratórios modernos e equipados que propiciam novos estudos e a evolução constante de seus alunos.

Obrigada às Cabanhas que disponibilizaram seus animais e nos receberam com muita atenção e apreço.

RESUMO

ESTRESSE OXIDATIVO SANGUÍNEO E SEMINAL EM EQUINOS

Autor Andressa Moneiro Gressler Stumm
Orientador: Dr. Lucas Carvalho Siqueira
Co- Orientadora: Dr^a Patricia Wolkmer

A criação e venda de equídeos no Brasil movimentam milhões de reais todos os anos, objetivando manter a lucratividade da criação, faz-se necessário o uso de modernas biotécnicas de reprodução. A inseminação artificial é a técnica mais utilizada, ela facilita a coleta, o armazenamento e a venda de material genético. O resfriamento do sêmen possibilita o transporte e a conservação por um período de tempo, porém todo o processo deve ser realizado em todas as etapas com o máximo de cuidado e eficiência. O espermatozóide é uma célula aeróbica, o oxigênio é um elemento essencial para manutenção de suas funções, porém em elevadas concentrações pode levar à formação de espécies reativas ao oxigênio (ROS), causadoras de diversos danos às células espermáticas. Esta pesquisa avaliou a correlação entre a produção de espécies reativas ao oxigênio sanguíneo e se a mesma reflete o nível de oxidação no líquido seminal e consequentemente na viabilidade e motilidade dos espermatozoides. Esta pesquisa analisou a reação entre a produção de ROS e os parâmetros seminais durante a curva de resfriamento do sêmen diluído. Foi coletado de sangue e sêmen de 09 garanhões da raça Crioula, logo após a coleta foram analisados através do soro e níveis de peroxidação lipídica no plasma seminal através de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Foi adicionado o conservante ao sêmen e posteriormente resfriado e armazenado, foi realizada a análise de sêmen através do TBARS e atividade catalase durante o período de resfriamento. A investigação demonstrou que os níveis de peroxidação lipídica no plasma podem ser utilizados como marcador de estresse oxidativo seminal, porém a peroxidação lipídica não apresentou correlação deste aumento com a morte dos espermatozoides durante o armazenamento a 5°C por 72 horas. Este trabalho tem como objetivo, avaliar se a produção de espécies reativas ao oxigênio sanguíneo reflete o nível de oxidação no líquido seminal, avalia ainda se existe relação entre a produção de espécies reativas ao oxigênio e os parâmetros seminais durante a curva de resfriamento do sêmen diluído.

Palavras chave: ROS, TBARS, Sêmen.

ABSTRACT

OXIDATIVE STRESS AND BLOOD IN EQUINE SEMINAL

Author^a: Andressa Moneiro Gressler Stumm
Advisor: Prof. Dr. Lucas Carvalho Siqueira
Co-Advisor: Prof^a. Dr^a Patricia Wolkmer

The creation and sale of horses in Brazil moves million of reais every year in order to maintain the profitability of creation, it is necessary the use of modern reproductive biotechnologies. Artificial insemination is the most used technique, it facilitates the collection, storage and sale of genetic material. The semen cooling enables the transportation and storage for a period of time, but the process must be carried out in all stages with the utmost care and efficiency. The spermatozoon is an aerobic cell, oxygen is an essential element for the maintenance of its functions, but in high concentrations can lead to the formation of reactive oxygen species (ROS), causing extensive damage to sperm cells. This study evaluated the correlation between the production of reactive oxygen species in blood and whether it reflects the oxidation level in the seminal fluid and consequently the viability and motility. This research analyzes the reaction between the production of ROS and semen parameters during the cooling curve of the diluted semen. It was collected from blood and semen of 09 stallions of the Crioulo breed, immediately after collection samples were analyzed using the serum and lipid peroxidation levels in seminal plasma through reactive substances to thiobarbituric acid (TBARS). The preservative to the semen and then cooled and stored, was carried out the analysis of semen through the TBARS and catalase activity during the cooling period was added. Research has shown that levels of lipid peroxidation in plasma can be used as seminal oxidative stress marker, but lipid peroxidation did not correlate this increase in the death of the sperm during storage at 5 ° C for 72 hours. This study aims to evaluate the production of reactive species to blood oxygen reflects the oxidation level in the seminal fluid also assesses whether there is a relationship between the production of reactive oxygen species and the semen parameters during the cooling curve of the diluted semen.

Key words: ROS, TBARS, Semen.

LISTA DE FIGURAS

- Figura1- Para cada duas moléculas de água oxigenada expostas à enzima catalase, ocorrerá a quebra e a formação de duas moléculas de água e uma de gás oxigênio..... 20
- Figura 2- Reação de redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) água (H_2O) concomitante oxidação da glutathiona reduzida (GSH). 20
- Figura 3- Reação de redução de peróxidos a álcoois, catalisada pela GPx..... 20

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATP- Adenosina trifosfato
ERO: espécies reativas ao oxigênio
FA: fosfatase alcalina
FSH: Hormônio folículo-estimulante
GPC- glicerilfosforilcolina
GSH- glutationa reduzida
H₂O₂- peróxido de hidrogênio
HO₂: hidroperoxila
IgA- Imunoglobulina
LH- Hormônio luteinizante
MDA- malondialdeído
NADH- nicotinamida adenina dinucleotídeo
O- Oxigênio
O₂- - ânion superóxido
OH- - hidroxila
ROS - Espécies Reativas ao Oxigênio
SOD - superóxido dismutase
TBARS - teste das substancias reativas com ácido tiobarbitúrico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	09
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1 O Espermatozóide	11
2.2 O Plasma seminal	14
2.2.1 Influência do plasma seminal no processo de resfriamento do sêmen equino	16
2.3 Resfriamento do sêmen equino	17
2.4 Influência do garanhão na qualidade do sêmen	17
2.5 Radicais livres	17
2.6 Estresse oxidativo	18
2.7 Defesas antioxidantes	19
2.7.1 Enzimas antioxidantes.....	19
2.7.2 Antioxidantes não enzimáticos	20
3 ARTIGO	22
4 CONCLUSÕES	32
REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

O complexo do agronegócio dos equídeos no Brasil gera cerca de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos, movimentando mais de R\$ 7,5 bilhões anuais na economia e possui uma tropa de aproximadamente 5,6 milhões de cabeças. Somente em 2011, foi arrecadada uma quantia de aproximadamente R\$ 400 milhões em leilões de cavalos contra R\$ 22,5 mil em 1995 (LIMA *et al.*, 2012). Objetivando manter a criação competitiva e lucrativa, faz-se necessário a utilização de modernas biotécnicas de reprodução, com o objetivo de diminuir o custo de produção e facilitar a comercialização. A inseminação artificial é uma técnica largamente utilizada na reprodução equina. Sua utilização oferece várias vantagens sobre a monta natural, como a otimização do uso do garanhão por temporada de monta, aumentando a eficiência reprodutiva, a diminuição dos riscos de acidentes durante a cobertura e a redução da transmissão de doenças venéreas (SAMPER, 2000).

Entre os tipos de sêmen equino utilizados na inseminação artificial, o sêmen resfriado é o mais utilizado para conservação e transporte, pois, quando utilizado até 24 horas após a coleta, possibilita maiores taxas de fertilidade em comparação ao sêmen congelado. O aumento do uso de sêmen resfriado nos últimos anos ocorreu principalmente após a liberação dessa biotecnologia pela maioria das associações de criadores e também pela alta proporção de garanhões com baixa resposta ao processo de congelamento de sêmen (VIDAMENT *et al.*, 1997). Apesar de relativamente simples, a execução destes processos necessita de cuidados especiais em todas suas fases. Ao se resfriar o sêmen de 37°C a 5°C, a taxa de refrigeração deve ser controlada, principalmente entre 19°C e 8°C, intervalo este em que pode ocorrer o choque térmico (MORAN *et al.*, 1992). Nesta faixa de temperatura, os lipídeos da membrana estão passando pela fase de transição, indo do estado fluido para o gel (STRYER, 1992). Os danos celulares podem ser minimizados pela adição de lipídeos (gema do ovo) ou lipoproteínas (leite) ao diluidor (AMANN & GRAHAM, 1993; GRAHAM, 1996).

Aurich (2005) define como consequências do choque térmico, consequência de queda de temperatura em taxas superiores aquelas indicadas para a espécie, as alterações caracterizadas por um modelo anormal de movimento e rápida queda da motilidade espermática, lesões nas membranas, redução do metabolismo, perda de enzimas e de outros componentes intracelulares. Aurich (2005) relata ainda que a interação entre a membrana

plasmática do espermatozóide e os componentes específicos do plasma seminal parece interferir na suscetibilidade da membrana aos prejuízos causados pelo estresse térmico.

Atualmente novas técnicas bioquímicas possibilitaram a investigação do estresse oxidativo no sêmen, o espermatozóide equino produz fisiologicamente espécies reativas de oxigênio (ROS). Para garantir concentrações de ROS compatíveis com a viabilidade celular, tanto os espermatozoides quanto o plasma seminal possuem diversos mecanismos de defesa antioxidante (BALL *et al.*, 2001). Entretanto, quando é estabelecido um desequilíbrio entre a produção e a eliminação de ROS, diversos danos oxidativos podem ocorrer na célula espermática como, por exemplo, alterações na fluidez da membrana plasmática, com consequente perda da motilidade e da capacidade fertilizante.

Diversos trabalhos mostraram que os processos de manipulação do sêmen podem levar ao aumento a produção de ROS, bem como diminuir as defesas antioxidantes do sêmen (BALL *et al.*, 2001; AGARWAL & SAID, 2005; BAUMBER *et al.*, 2005). Desta forma, este trabalho objetiva avaliar se a produção de espécies reativas ao oxigênio sanguíneo reflete o nível de oxidação no líquido seminal. Ainda, estudará se existe relação entre a produção de espécies reativas ao oxigênio e os parâmetros seminais durante a curva de resfriamento do sêmen diluído.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O Espermatozóide

O espermatozóide é formado por três regiões altamente especializadas: a cabeça que acomoda o DNA da célula, estrutura vital durante a interação espermatozóide oócito; a peça intermediária, envolvida na produção de energia por acomodar as mitocôndrias e o flagelo, que está envolvido com a motilidade espermática (HAFEZ, 1995).

Sendo o espermatozóide uma célula aeróbia, o oxigênio torna-se um elemento essencial para manutenção de suas funções. Entretanto, este elemento pode ocasionar sérios danos à célula espermática, caso esteja presente em elevadas concentrações, pela elevada formação de ROS. O elemento oxigênio (O) é considerado um radical livre, já que apresenta desemparelhamento de elétrons na sua última camada, o que lhe confere alta reatividade (AITKEN & BAKER, 2006). As ROS incluem todos os radicais derivados do oxigênio e encontrados em todos os sistemas biológicos. Entre as espécies reativas do oxigênio, as mais importantes são o radical ânion superóxido (O₂⁻), hidroperoxila (HO₂), hidroxila (OH⁻) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (HALLIWELL, 1994).

Todas as células aeróbicas possuem substratos e enzimas capazes de neutralizar o potencial efeito tóxico das ROS, porém as defesas antioxidantes do espermatozóide são muito susceptíveis ao estresse oxidativo (NAIR *et al.*, 2006). Quando em condições anaeróbicas, as células espermáticas também têm a capacidade de gerar as ROS. A produção de ROS no sêmen ocorre principalmente por espermatozóides imóveis e os morfológica e funcionalmente anormais, e, dentre estas, nas células que possuem gotas citoplasmáticas proximais e distais. Sendo assim, acredita-se que a presença deste citoplasma residual aumentaria a capacidade destas células imaturas de gerarem NADPH, que serviria como fonte de elétrons para a produção de ROS. A excessiva geração de NADPH está relacionada com os níveis de ROS, as quais são geradas espontaneamente pelos espermatozóides após sua liberação da cauda do epidídimo (AITKEN *et al.*, 2004; AITKEN & BAKER, 2006).

Existem dois sistemas de produção de ROS em nível espermático, um localizado na membrana plasmática, semelhante à NADPH oxidase (que é enzima geradora de H₂O₂), e outro na peça intermediária e integrado ao sistema respiratório mitocondrial espermático,

oxido-redutase dependente de NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo) (AITKEN & BAKER, 2006; MAKKER *et al.*, 2009). Por isso, NADPH e NADH são fontes geradoras de ROS (AITKEN e BAKER, 2006; NAIR *et al.*, 2006)

Em geral, observa-se equilíbrio entre a produção de radicais livres e de seus inibidores. Em condições fisiológicas, ou seja, em concentrações reduzidas, as espécies reativas ao oxigênio mediam funções espermáticas normais, como capacitação, hiperativação, reação acrossomal e fusão do espermatozóide com o ovócito. Entretanto, pode ocorrer estresse oxidativo das células, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, decorrente do desequilíbrio entre a produção de ROS e ação dos antioxidantes encontrados no sêmen (SALEH & AGARWAL, 2002).

A produção elevada de espécies reativas ao oxigênio induz danos à membrana mitocondrial, levando a modificações patofisiológicas nos espermatozóides (MAKKER *et al.*, 2009). O efeito prejudicial das ROS sobre o espermatozóide foi sugerido por Macleod (1943), demonstrou que a exposição do espermatozóide humano a altas concentrações de oxigênio resultou em toxicidade, com perda de sua motilidade devido à ocorrência da peroxidação lipídica (MAKKER *et al.*, 2009). Os efeitos desta reação incluem perda irreversível de motilidade, inibição da respiração espermática, lesões no DNA espermático e perda de enzimas intracelulares, interferindo na capacidade fertilizante do espermatozóide. De fato, a motilidade espermática é o indicador mais sensível do estresse oxidativo, situação em que ocorre a depleção do ATP intracelular e insuficiente fosforilação da proteína do axonema. As ROS também produzem extensivos danos às proteínas, modificam o citoesqueleto e causam alterações de mecanismos celulares (SALEH & AGARWAL, 2002; SALEH *et al.*, 2009). O citoesqueleto proporciona o suporte para as estruturas celulares móveis especializadas, como cílios e flagelos, promovendo sua ativação.

Em mamíferos, a membrana plasmática dos espermatozóides é rica em ácidos graxos poliinsaturados, sendo considerado um fator importante para a viabilidade do ejaculado submetido aos processos de criopreservação (PARKS & LINCH, 1992). Entretanto, as células espermáticas são altamente susceptíveis aos danos causados pelas ROS, devido à alta quantidade desses ácidos graxos poliinsaturados presentes em sua membrana plasmática e baixas concentrações de enzimas antioxidantes em seu citoplasma. Assim, as membranas espermáticas tornam-se susceptíveis a danos peroxidativos induzidos por radicais livres, que determinam uma substancial perda de ácidos graxos poliinsaturados, resultando em conseqüente redução da fluidez, responsável pela fusão espermatozóide-ovócito, na atividade das enzimas reguladoras que se ligam ao cálcio (Ca²⁺) e na motilidade espermática

(MORITZ *et al.*, 2004; BAUMBER *et al.*, 2005; AITKEN & BAKER, 2006; NAIR *et al.*, 2006; MAKKER *et al.*, 2009). Ao relacionar a excessiva produção de ROS com as patologias espermáticas mais frequentemente observadas, destacam-se as seguintes alterações: cabeças anormais, defeitos de acrossoma, de peça intermediária e de cauda, fragmentação do DNA e gotas citoplasmáticas residuais na peça intermediária (GOMEZ *et al.*, 1998).

Alguns procedimentos laboratoriais podem interferir na concentração de oxidantes espermáticos, demonstrando que a produção de ROS pode ser aumentada em amostras de sêmen de animais domésticos submetidas à centrifugação (TWIGG *et al.*, 1998) e congelamento (BALL *et al.*, 2001). Durante o processo de criopreservação, observa-se redução irreversível na motilidade, na integridade morfológica e na capacidade fertilizante dos espermatozoides, resultantes do acúmulo de produtos tóxicos do metabolismo celular ou pelo aumento da produção de ROS. Os processos de centrifugação, refrigeração, congelamento e descongelamento causam danos à membrana plasmática e ao acrossoma com redução do metabolismo espermático para produção de energia e da motilidade progressiva, prejudicando o tempo de sobrevivência e a capacidade fecundante dos espermatozoides no sistema reprodutor feminino (KADIRVEL *et al.*, 2009). Por essa razão é importante reduzir ao máximo a manipulação do sêmen até o momento da inseminação.

Metodologias sistêmicas utilizadas para a avaliação da peroxidação lipídica em sistemas biológicos medem a formação de produtos gerados durante as diferentes fases deste processo oxidativo. Esta avaliação sistêmica pode refletir o estado oxidativo de diversos órgão e tecidos. Uma das metodologias mais utilizadas para avaliação da peroxidação lipídica é através da quantificação do malondialdeído (MDA). O MDA é um dialdeído formado como um produto secundário durante a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados por cisão beta dos AGPI peroxidados, principalmente o ácido araquidônico. É bastante popular porque é simples e rápido, porém inespecífico. Consiste na medida de um cromógeno róseo formado pela reação do MDA com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico, em meio ácido e alta temperatura. Essa reação é chamada de “teste das substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico (TBARS)”. O protocolo pode ser realizado tanto no líquido seminal quanto sérico (sanguíneo). Desta forma, a correlação negativa entre peroxidação lipídica sérica e/ou motilidade espermática poderia ser utilizada como marcador oxidativo auxiliando na seleção de equinos para a reprodução. Ainda, poderia servir como base para próximos experimentos utilizando a suplementação de antioxidante, melhorando a qualidade espermática e consequentemente melhorando os índices reprodutivos animais.

2.2 O Plasma seminal

O sêmen é composto por duas frações distintas: os espermatozóides, que compõem menos de 1% do volume total e o plasma seminal (HAFEZ *et al.*, 1988). A primeira porção ejaculada é a fração pré-espermática, translúcida, e provêm das glândulas bulbouretrais e da próstata. Esta fração possui a função de limpeza da uretra. A segunda fração possui aspecto leitoso, é rica em espermatozóides, glicerilfosforilcolina (GPC) e ergotineína, e é composta por secreções do epidídimo e da ampola do ducto deferente. A terceira porção contém poucos espermatozóides, porém grandes quantidades de ácido cítrico e gel proveniente das glândulas vesiculares, com a função de carrear os poucos espermatozóides que restaram na uretra (AMANN *et al.*, 1993).

O plasma seminal possui inúmeras funções sobre o metabolismo espermático e o processo de fecundação, é produzido e secretado nas glândulas acessórias e responsável pelo processo de maturação do espermatozóide durante o trânsito epididimário e a ejaculação, são nestas fases que os espermatozóides desenvolvem motilidade progressiva, habilidade de reconhecimento, ligação com a zona pelúcida e capacidade de fusão com a membrana plasmática do oócito. Possui ainda ação antimicrobiana a qual protege a acrosina por meio de inibidores de proteases, age como mediador da capacitação espermática e da resposta inflamatória pós coital uterina.

Na espécie equina, a adição de plasma seminal de garanhões de alta fertilidade à espermatozóides de animais de baixa fertilidade elevou a resistência do espermatozóide à congelação e descongelação, concluindo que a composição do plasma seminal é um fator que determina a susceptibilidade individual de garanhões para a criopreservação do sêmen (AURICH *et al.*, 1996).

Alguns constituintes do plasma seminal equino já foram isolados e identificados, entretanto informações sobre sua origem, estrutura e funções continuam limitados (MCDOWELL e TIMONEY, 1996). O plasma seminal contém não usualmente altos níveis de ácido cítrico, ergotoneína, frutose, glicerilfosforilcolina e sorbitol. Quantidades apreciáveis de ácido ascórbico, ácidos graxos, aminoácidos, peptídios, proteínas, lipídios e numerosas enzimas acham-se também presentes (WHITE, 1980). Constituintes antimicrobianos incluindo seminalplasmina (SHIVAJI *et al.*, 1984) e imunoglobulinas, principalmente a da classe IgA (ABLIN, 1974), são constituintes do plasma seminal. Em adição, uma variedade de substâncias hormonais incluindo andrógenos, estrógenos,

prostaglandinas, FSH, LH, material semelhante a gonadotrofina coriônica, hormônio do crescimento, insulina, glucagon, prolactina, relaxina, hormônios liberadores da tireóide e encefalinas foram detectadas no plasma seminal (MANN & LUTWAK – MANN, 1981).

As maioria das proteínas presentes no plasma seminal é proveniente do epidídimo e estão envolvidas na remodelação da membrana espermática, que ocorre durante o trânsito epididimário e após a ejaculação (DACHEUX, 2003). Além disso, o plasma seminal possui evidente efeito imunossupressor sobre a endometrite pós-cobertura, por meio da supressão da ativação do complemento e da quimiotaxia das células polimorfonucleares (TROEDSSON, 2005).

A grande maioria das enzimas encontradas no plasma seminal funciona como agente antioxidante, prevenindo a peroxidação dos lipídios de membrana pelas espécies reativas ao oxigênio e, conseqüentemente, fragmentação do DNA espermático (LEWIS, 1997).

Catalase, superóxido dismutase (SOD) e sistema peroxidase/reductase (GPx/GPD) são as principais enzimas com ação antioxidante presentes no sêmen. De acordo com Ball et al (2000), o sêmen equino possui uma atividade de catalase e a maior parte desta atividade se deve ao plasma seminal. Portanto parecem existir altos níveis de SOD e GPx em plasma seminal equino (Almeida, 2010).

A enzima fosfatase alcalina (FA) é expressa em grandes quantidades nos testículos e epidídimos, a quantificação desta enzima pode ser utilizada como marcador para diferenciar azoospermia verdadeira (altos níveis de FA) de falhas na ejaculação (baixos níveis de FA) e azoospermia por bloqueio do ducto deferente (TURNER, 2003).

A composição iônica do plasma seminal varia nas diferentes espécies. Os principais íons do plasma seminal são: sódio, potássio, cloreto, cálcio e o magnésio. O sódio e o potássio se encontram em maior concentração e o cálcio e magnésio em menor quantidade (WITE, 1988).

O íon magnésio é considerado um marcador da secreção das vesículas seminais e age como antagonista intracelular do cálcio possui papel fundamental no metabolismo energético e na síntese de ácidos nucleicos. O íon cálcio é citado por inúmeros autores como desencadeador da reação acrossômica nos espermatozoides. O zinco é fundamental para a motilidade espermática, exercendo atividade antioxidante e fator antimicrobiano para bactérias gram positivas e gram negativas. O cobre é essencial para a funcionalidade de algumas enzimas. A enzima Cu-Znsuperóxido dismutase (SOD), envolvida na proteção dos espermatozoides contra radicais livres, e a enzima citocromo oxidase, responsável pelo fornecimento de energia e pela imunidade celular e humoral, são dependentes do íon cobre.

Estudos indicam que elevados níveis de cobre reduzem o processo oxidativo e a glicólise, o que pode levar à imobilidade e redução de viabilidade dos espermatozóides (MAREK, 2001).

Além dessas enzimas, o plasma seminal apresenta outros componentes que atuam como antioxidantes, entre eles, a vitamina E, vitamina C, urato, albumina, taurina e hipotaurina (ALMEIDA; BALL, 2005).

2.2.1 Influência do plasma seminal no processo de resfriamento do sêmen equino

Existem muitas tentativas de demonstrar o efeito benéfico da adição de plasma seminal ao espermatozóide armazenado (resfriado ou congelado) na espécie equina (BRAUN et al, 1994; AURICH *et al.*, 1996; KATILA *et al.*, 2002; MOORE, 2005). O efeito do plasma seminal sobre o resfriamento e a congelabilidade e sua influência sobre a fertilidade dos espermatozóides equinos permanece controverso, relatos literários são em sua maioria conflitantes entre si, uma vez que as metodologias utilizadas nas pesquisas não seguem um padrão, tornando a comparação entre estudos de difícil aplicação.

As técnicas de congelamento de sêmen preconizam a retirada do plasma seminal, Rigby (2001) et. al. demonstraram que o efeito do plasma seminal sobre a motilidade espermática para alguns ganhos pode ser prejudicial e se torna mais evidente em condições de refrigeração. Animais que apresentavam redução acentuada da motilidade espermática após o processo de refrigeração convencional (5°C/24-48h), demonstraram um aumento na cinética espermática quando há a remoção parcial do plasma seminal antes da refrigeração.

Almeida *et al.* (2010) avaliaram diferentes concentrações de plasma seminal (0%, 5%, 25% e 50%) proteção contra o estresse oxidativo e danos aos espermatozóides equinos criopreservados, e concluíram que a adição de plasma seminal protege contra a peroxidação lipídica durante a criopreservação. Entretanto quando utilizado em concentrações acima de 25%, leva a uma redução na viabilidade dos espermatozóides, indicando que baixas concentrações de plasma seminal são essenciais para a manutenção espermática. Ficou comprovado que espermatozóides recuperados da cauda do epidídimo são capazes de fertilizar o ócito, ou seja, sem nenhum contato com o produto de secreção das glândulas acessórias.

As ROS induzem dano ao DNA espermático e causam rápida perda do potencial fertilizante dos espermatozóides por meio da peroxidação lipídica da membrana plasmática. Variações individuais entre os ganhos, como na composição do plasma seminal e das membranas espermáticas, podem interferir na manutenção da motilidade espermática e

integridade da membrana plasmática durante o processo de refrigeração, podendo ocasionar redução na taxa de fertilidade (BATELLIER *et al.*, 2001; KARESKOSKI *et al.*, 2006).

2.3 Resfriamento do sêmen equino

O uso de sêmen equino refrigerado tem aumentado muito nos últimos anos, resultado da sua aceitação entre as associações de criadores. Esta técnica facilita o manejo, já que não há necessidade da presença da égua e do garanhão no mesmo local (SQUIRES *et al.*, 1998). O armazenamento do sêmen diluído em baixas temperaturas prolonga a viabilidade espermática pela redução do consumo de energia e da formação de subprodutos (ALTHOUSE *et al.*, 1998). Segundo Aurich (2008), a fertilidade do sêmen refrigerado é mantida por 24-48 horas. Após esse tempo, a taxa de prenhez diminui drasticamente. Uma das razões para a redução da fertilidade durante a estocagem do sêmen é a peroxidação de lipídios na presença de íons de oxigênio. A membrana do espermatozóide contém grandes quantidades de ácidos graxos insaturados particularmente susceptíveis à peroxidação, com subsequente perda da integridade da membrana e função celular, além da redução da motilidade espermática (AURICH *et al.*, 1997).

Os processos utilizados para a preservação do sêmen equino durante diferentes períodos de tempo são de suma importância para a reprodução de equinos, a preservação da fertilidade e motilidade do sêmen é fundamental no processo de inseminação artificial e deve ser o principal foco em todas as etapas, prevenindo o estresse oxidativo, preservando a motilidade espermática e mantendo a integridade da membrana.

2.4 Influência do garanhão na qualidade do sêmen

Os indivíduos podem ser classificados como produtores de sêmen de alta e baixa congelabilidade, dependendo das características estruturais da membrana, o que é geneticamente determinado, predispondo os espermatozoides à sobrevivência aos estresses da criopreservação (WATSON, 2000).

Equinos, ao contrário de algumas espécies animais, não foram selecionados por sua habilidade reprodutiva, diversos autores concordam que existe uma alta variabilidade da qualidade e da congelabilidade seminal entre garanhões e em muitas vezes até mesmo entre ejaculados de um mesmo garanhão.

2.5 Radicais livres

O termo radical livre não é considerado o mais adequado, pois nem todas as espécies reativas do oxigênio são radicais livres, e estas nem sempre são oxidantes (MAIA, 2006). Quimicamente, os radicais livres são átomos, moléculas ou íons que apresentam um elétron desemparelhado, reativo e instável, o qual, para alcançar a estabilidade, tende a se ligar a outro elétron (SOUZA & FERREIRA, 2007). As espécies reativas de oxigênio (ROS), também conhecidas como radicais livres, são radicais de oxigênio diatômicos gerados através de sistemas aeróbicos ou parcialmente aeróbicos a partir de radicais ânions superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido (H_2O_2) e hidroxil (OH).

O espermatozóide de mamíferos é extremamente susceptível aos efeitos citotóxicos das ROS e ao estresse oxidativo, uma vez que o sistema intracelular do espermatozóide é fraco, devido à escassez de citoplasma, porém o plasma seminal é rico em antioxidantes e oferece proteção ao espermatozóide. Os radicais livres em excesso induzem danos sobre a motilidade, viabilidade, produção de energia e integridade do DNA, a capacidade de fusão dos gametas, podendo interromper a reação em cadeia da peroxidação dos lipídios das membranas espermáticas.

2.6 Estresse oxidativo

O espermatozóide é uma célula aeróbica. Assim, o oxigênio torna-se um elemento essencial para manutenção de suas funções. Entretanto, este elemento pode ocasionar sérios danos à célula espermática, caso esteja presente em elevadas concentrações, pela elevada formação de ROS (AITKEN & BAKER, 2006). Em condições normais, observa-se um equilíbrio entre a produção de espécies reativas e os sistemas de defesa antioxidante do organismo. Quando níveis de ROS sobrecarregam o sistema de defesa antioxidante do corpo, o estresse oxidativo ocorre. Quando em níveis elevados, o estresse oxidativo pode danificar células, tecidos ou órgãos (SALEH, *et al.*, 2003).

O estresse oxidativo é consequência de um desequilíbrio na quantidade de espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais são também comumente denominadas radicais livres (ANDRADE, 2010). Esse desequilíbrio pode ser causado por diversos fatores relacionados com o aumento da produção de ERO e/ou a redução da disponibilidade de antioxidantes. Entre eles, pode-se citar, como exemplo, a nutrição inadequada e a permanência dos animais em condições de estresse (ANDRADE, 2010).

O estresse oxidativo pode levar as células a morte, a um dano ou simplesmente adaptarem-se, sendo que elas podem tolerar um estresse moderado, o que leva a ativação da síntese de sistemas de defesa antioxidante, sendo assim o balanço oxidante/antioxidante é restabelecido, sem causar maiores danos às células. A produção elevada de espécies reativas ao oxigênio induz danos à membrana mitocondrial, levando a modificações patofisiológicas nos espermatozoides (MAKKER *et al.*, 2009).

2.7 Defesas antioxidantes

O sistema de defesas antioxidantes possui a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria das espécies reativas. Esta inibição e/ou redução dos danos é realizada pelas enzimas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas.

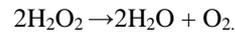
2.7.1 Enzimas antioxidantes

Os antioxidantes são sistemas enzimáticos de defesas, responsáveis por neutralizar os radicais livres quando os mesmos encontram-se em quantidades excessiva no organismo, podendo se acumular e produzir produtos tóxicos para as células.

Superóxido dismutase é uma metaloproteína que possui isoformas que diferem tanto na composição quanto na localização celular. Uma das isoformas contém cobre e zinco, estando presente no citoplasma de células eucariotas e no espaço intermembranas mitocondrial. Outras isoformas contém manganês ou ferro, estando presentes na matriz mitocondrial e em maior parte dos procariotos.

A catalase também denominada de hidroperoxidase é uma enzima, um tipo de proteína que acelera as reações bioquímicas, é produzido por animais, vegetais e bactérias. A catalase está ligada ao processo de decomposição do peróxido de hidrogênio H_2O_2 , altamente deletério para o organismo, tal função degrada o peróxido de hidrogênio em água e gás oxigênio. Da seguinte forma:

Figura1- Para cada duas moléculas de água oxigenada expostas à enzima catalase, ocorrerá quebra e a formação de duas moléculas de água e uma de gás oxigênio



Enzimas do tipo peroxidase atuam removendo espécies reativas e as utilizando na oxidação de outros substratos. A glutaciona peroxidase atua removendo o H_2O_2 e reduzindo o mesmo a H_2O , concomitante com a oxidação da glutaciona reduzida (GSH), que age doando hidrogênios (Figura 2). Pode também agir em outros peróxidos que não o H_2O_2 (Figura 3), sendo assim considerado um dos principais sistemas de defesa antioxidante (WENDEL, 1981).

Figura 2: Reação de redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a água (H_2O) concomitante oxidação da glutaciona reduzida (GSH).



Fonte: Adaptado de Halliwell & Gutteridge (1999)

Figura 3- Reação de redução de peróxidos a álcoois, catalasada pela GPx



Fonte: Adaptado de Halliwell & Gutteridge (1999).

2.7.2 Antioxidantes não enzimáticos

Os antioxidantes não enzimáticos são conhecidos como antioxidantes sintéticos ou suplementos da dieta. Fazem parte do sistema não enzimático, um grande número de compostos de baixo peso molecular, incluindo o ácido ascórbico, o tocoferol, diferentes compostos de selênio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico, ácido-lipoico (NORDBERG & ARNÉR, 2001), zinco, taurinas, hipotaurinas, glutacionas, betacaroteno e caroteno (MAIA, 2006). Esse sistema pode atuar em duas linhas: como removedor do agente, antes que ele cause lesão, ou como reparador da lesão ocorrida. Com exceção da vitamina E, que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes encontra-se no meio intracelular (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Dentre os antioxidantes envolvidos diretamente na reprodução, merecem destaque o ácido ascórbico (vitamina C), o tocoferol (vitamina E) e o ácido α -lipoico.

O ácido ascórbico, também denominada vitamina C ou ascorbato, é uma vitamina hidrossolúvel que tem sido considerada o mais importante antioxidante do fluido extracelular. O ácido ascórbico reduz as ERO e age também prevenindo a formação de hidroperóxido de lipídios nas lipoproteínas plasmáticas, protegendo a célula dos danos oxidativos. Estudos *in vitro* sugerem que, em altas concentrações, o efeito antioxidante do ácido ascórbico é diretamente relacionado com a regeneração do tocoferol pela redução dos radicais tocorferil em um ciclo redox. O ácido ascórbico exerce três importantes funções, são elas: síntese do colágeno, antioxidação e secreção hormonal, essas funções explicam seus efeitos na reprodução.

Vários estudos relatam os efeitos diretos da deficiência do ácido ascórbico sobre a fertilidade masculina em animais de laboratório e em espécies domésticas. Baixas concentrações de ácido ascórbico em sêmen bovino foram associadas ao mau desempenho reprodutivo, enquanto cobaias sofreram degeneração do epitélio germinativo testicular. Concentrações baixas de ácido ascórbico foram associadas com baixa contagem espermática, aumento do número de espermatozoides anormais, redução da motilidade e aglutinação.

Já Yousef et al. (2007) trabalharam com suplementação de ácido ascórbico em coelhos machos e verificaram que este antioxidante reduziu significativamente as concentrações de radicais livres e aumentou a atividade de enzimas antioxidantes (GST, SOD e CAT) em comparação com animais não tratados.

Principal antioxidante lipossolúvel protege os ácidos graxos poli-insaturado dos tecidos contra a peroxidação, é um importante removedor de radicais peroxil e o mais importante inibidor da reação em cadeia da lipoperoxidação. Os efeitos do tocorfenol variam de acordo com as doses utilizadas, seus efeitos em sêmen refrigerado de equinos não se mostraram importantes, em sêmen fresco ele prolonga o período de conservação e melhora a motilidade dos espermatozoides e diminui danos celulares.

No aparelho reprodutor feminino ele se presente em uma quantidade significativa no ovário e no fluído folicular. A adição de tocoferol ao meio de cultivo de embriões bovinos melhorou a competência de desenvolvimento ao estágio de blastocisto (OLSON & SEIDEL, 2000), além de suprimir os danos oxidativos e potencializar o desenvolvimento de embriões suínos (KITAGAWA *et al.*, 2004).

Antioxidante endógeno atua sinergicamente com o α -tocorfenol e com o ácido ascórbico, é imprescindível para mantê-los na forma reduzida. É um tripeptídeo, o principal

tiol intracelular de baixo peso molecular presente em grande parte das células, é formado por glutamato, cisteína e glicina. Atua também como cofator enzimático, sendo particularmente importante na reação catalisada pela glutathione peroxidase, enzima que decompõe peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos.

3 ARTIGO

PLASMA LIPID PEROXIDATION AS A MARKER FOR SEMINAL OXIDATIVE STRESS IN STALLION

Andressa Moneiro Gressler Stumm, Patrícia Wolkmer, Luiz Felipe Krueel Borges, Jamile Hasan, Bibiana Teló Moraes, Marilian Neuenschwander, Lucas Carvalho Siqueira¹.
Universidade de Cruz Alta, BRAZIL

ABSTRACT

This experiment aim to evaluate the correlation between lipid peroxidation levels on serum and seminal plasma. And also, investigates the lipid peroxidation on extended semen samples and its effects and sperm motility during a 72 h refrigeration period. Blood and semen was collected from fertile Crioulo stallions. Serum and seminal plasma lipid peroxidation levels were analyzed by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) immediately after semen collection. After addition of extender semen was cooling and storage at 5 °C. Semen analyses, TBARS and catasase activity was performed in extended semen at 0, 24, 48, and 72 hours. Research show levels of plasma lipid peroxidation can be used as an indicative o seminal oxidative stress. Also, lipid peroxidation does not increase substantially during semen storage. Lipid peroxidation and the antioxidant enzyme catalase do not seem to be the major cause of loss and motility and consequently reduction in fertility in stallion semen during storage for 72h at 5 °C.

Keywords: TBARS; Catalase; Horse; Semen; Sperm storage.

1 INTRODUCTION

Seminal quality parameters vary largely on stallions and even among ejaculates, especially when one considers the samples preservation periods. The low fertility of mares following artificial insemination with cooling stallions semen is reported (WATSON, 2000;

¹ Correspondence and reprints. Address: UNICRUZ - Universidade de Cruz Alta - Fone/Fax: +55 55 3321-1500 Campus Universitário Dr. Ulysses Guimarães - Rodovia Municipal Jacob Della Méa, km 5.6 - Parada Benito - CEP 98.005-972 Caixa Postal 838 - Cruz Alta/RS - BRASIL. E-mail address: lusiqueira@unicruz.edu.br (Siqueira, L.C.)

AURICH, 2005), and it is largely due to the loss of fertilizing ability of spermatozoa. The effects of oxidative stress are particularly important during sperm storage because during low temperature storage equine sperm are subjected to oxidative damage to membrane phospholipids, proteins and chromatin.

Damage to the sperm plasma membrane results in the irreversible loss of motility and/or fertilizing capability (MORRIS *et al.*, 2000; BAUMBER *et al.*, 2003; FERRUSOLA *et al.*, 2009; DOS SANTOS *et al.*, 2016). Moreover, sperm appear to have very limited amounts of reactive oxygen species (ROS) scavengers, and seminal plasma is a potent source of scavengers which functions to protect ejaculated equine sperm from the adverse effects of ROS. The removal of seminal plasma during semen processing may increase the susceptibility of sperm to oxidative stress because of the removal of these enzyme scavengers (BALL *et al.*, 2001; AITKEN *et al.*, 2012).

Lipid peroxidation seems to be an important source of spermatic damage and its reduction could be advantageous to refrigerated semen during extended periods. The assessment of lipid peroxidation on blood samples could be more practical to perform since does not requires semen collection and manipulation. Therefore, the aim of this experiment is to evaluate if there is correlation between lipid peroxidation levels on serum and seminal plasma. And also investigates the production of ROS on diluted semen samples and its effects and sperm motility during a 72 h refrigeration period.

2. MATERIAL AND METHODS

Animals

Nine fertile Crioulo stallions aged between 6 and 8 years were available. Animals were housed individually, fed hay twice daily, water and mineral supplements were freely available. All animals underwent a clinical general examination and testicular palpation before the experimental period.

Blood Collection

All blood samples were collected from the external jugular vein into glass tubes (Vacutainer tubes). Part of the material collected was allocated in tubes containing anticoagulant (ethylene-diaminetetraacetic acid - EDTA) for performance of hemogram and

fibrinogen to guarantee animal health. Serum samples were collected in tubes without anticoagulant and obtained by centrifugation at 2000g during ten minutes for thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assays.

Semen collection and processing

Semen was collected from all stallions by artificial vagina. Immediately after collection, the gel fraction was removed and semen was filtered. Volume and color of the ejaculate, motility, sperm concentration and pH were determined. The percentage of progressively motile spermatozoa was assessed with microscope (400x) and sperm concentration was determined using Neubauer chambers. Total sperm count per ejaculate was calculated from volume and sperm concentration. The pH was determined with test strips (Merck, Darmstadt, Germany).

To obtain the seminal plasma in the fresh semen, an aliquot sample was centrifuged ($600\times g$ for 10 minutes) for lipid peroxidation performance. The sample was immediately diluted in pre-warmed (37°C) extender (Botu-Crio, Botupharma) to a final concentration of 50×10^6 spermatozoa/mL. The semen samples were packed into 2mL microtubes. Cooling the samples at 5°C was performed in passive refrigeration containers (Botutainer, Botupharma, Botucatu, Brazil) with a cooling rate of $0.05^{\circ}\text{C}/\text{min}$ until stabilization at 5°C . Sperm analyses were performed at 0, 24, 48, and 72 hours after dilution cooling period. TBARS and catalase activity was evaluated in the total sample of extended semen (suspension) after cooling.

Analysis of motility

To evaluate the sperm motility, $10\mu\text{L}$ of semen were pipetted onto microscope slide. The percentage motility was determined arbitrarily on a 0 to 10-point scale, where 0 denoted 0% motility and 10 denoted 100% motility. The duration of motility was determined by recording the time from activation to the complete cessation of activity by the last spermatozoa in a field. One person conducted all of the sperm motility observations to reduce the degree of variation.

Lipid peroxidation analysis (TBARS assay)

Lipid peroxidation was estimated colorimetrically by measuring TBARS. Serum, seminal plasma and extended semen lipid peroxidation levels were assessed as described by Ohkawa *et al.*, 1979. Initially, 500 mL of sample were diluted in 1 mL of (vol:vol) solution of trichloroacetic acid 50 mM and centrifuged at 16,000 g, for 10 minutes. After centrifugation, 500 μ L of the supernatant were added to 500 μ L of a 0.8% solution of thiobarbituric acid in 0.05 N sodium hydroxide, plus acetic acid 2.5 M and sodium dodecyl sulfate 8.1% and incubated for 60 minutes at 100°C. To quench the reaction, samples were rapidly placed in ice after incubation and centrifuged. The TBARS were measured in a spectrophotometer (GE Healthcare, Amersham Place, United Kingdom) at a 532-nm wavelength. A baseline curve was prepared using a standard solution of malondialdehyde (MDA). Results are expressed in nanograms of MDA per milliliter.

Catalase (CAT) activity

Catalase activity in extended semen suspension was measured as described by Nelson and Kielsow (1972) with a slight modification. Sperm suspension was homogenized in 50mM potassium phosphate buffer, pH 7.5 at a proportion 1/5 (w/v). Decomposition of 30 mmol of H₂O₂ was systematically followed by monitoring the decrease in absorbance at 240 nm. The change in absorbance is directly proportional to the measure of catalase activity. The decrease in the absorption was followed for 3 min and mmol H₂O₂ degraded per min and defined as U/mg protein.

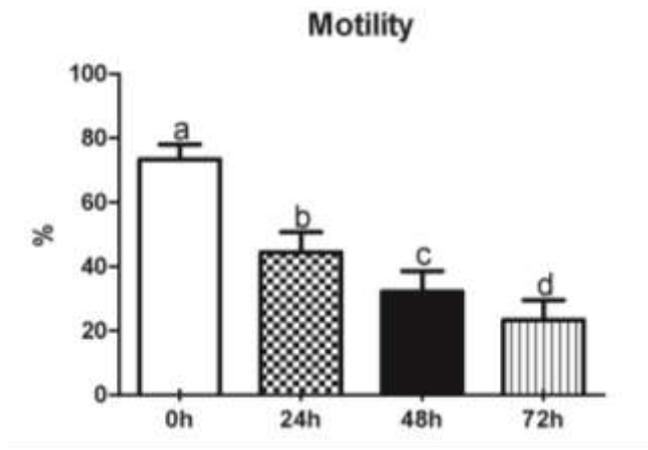
Data Analysis

All determinations were obtained from triplicate measurements. Results are expressed as mean \pm standard error. Experimental data were statistically analyzed using software GraphPad Prism, by one-way ANOVA. Differences between means were evaluated for significance using Tukey-test ($p < 0.05$). Pearson's correlation coefficients were used to assess the similarity between the serum and seminal TBARS values.

3. RESULTS

All collected ejaculates had normal characteristics, no change of volume and color. At the beginning of the experiment, the average progressive motility was $73.33 \pm 5.83\%$ and sperm concentration 125.80 ± 55.32 ($\times 10^6$ / ml). Gradual reduction in progressive motility was observed ($p < 0.0001$; Figure 1), with 22.22% (2/9) of the samples presenting less than 10% of sperm motility at 72 hours.

Figure 1. Progressive Motility (%) during cooled storage of extended semen. Analyses were performed at 0, 24, 48, and 72 hours after dilution and storage at 5°C . Non-coinciding index letters represent statistically significant differences ($p < 0.0001$; $n=9$).



Direct correlations between measured values of lipid peroxidation in serum and seminal plasma were observed (Figure 2). On the other hand, there was no correlation between extended semen lipid peroxidation and progressive motility at analyzed times ($p > 0.05$). Also, there was no significant difference on semen lipid peroxidation in the evaluated times (Figure 3).

Figure 2. Correlations between lipid peroxidation levels in serum and seminal plasma. Analyses were performed by thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assays at 0, 24, 48, and 72 hours after dilution and storage at 5⁰ C ($p \leq 0.05$; n=9).

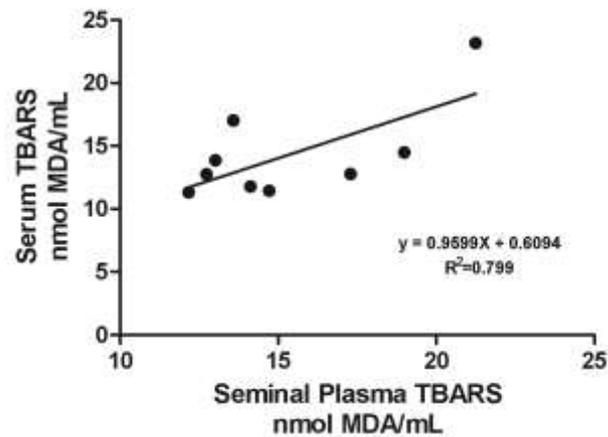
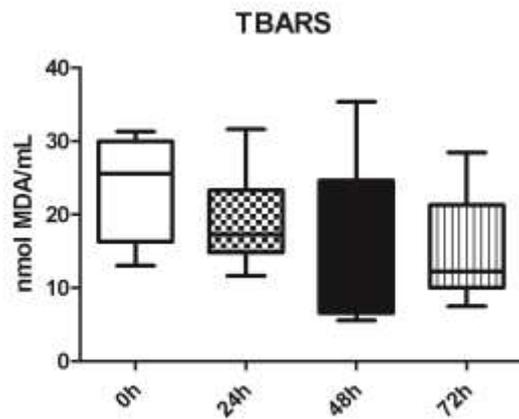
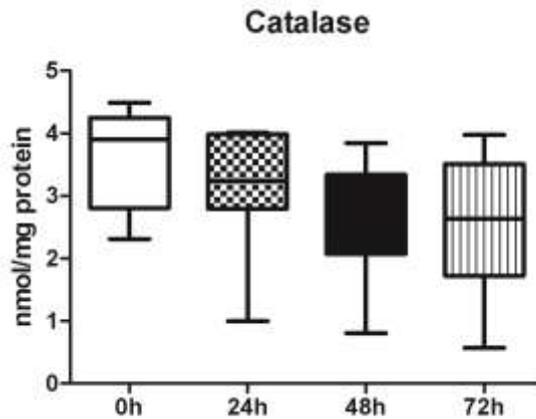


Figure 3. Thiobarbituric acid reactive substances levels in extended semen from 9 stallions analyzed immediately after collection and 24, 48, and 72 hours after dilution and storage at 5⁰ C ($p > 0.05$).



The CAT activity showed a tendency to decrease ($p = 0.065$) during the analyzed times (Figure 4). However, there was no correlation of CAT activity values and progressive motility.

Figure 4. Catalase (CAT) activity in extended semen assays at 0, 24, 48, and 72 hours after dilution and storage at 5⁰ C (p = 0.065; n=9).



4 DISCUSSION

Several papers show that spermatozoa are susceptible to oxidation of their plasma membranes due to the presence of polyunsaturated fatty acids (AITKEN *et al.*, 1989; RAO *et al.*, 1989; AITKEN, 1995; BAUMBER *et al.*, 2000; KANKOFER *et al.*, 2005; AITKEN *et al.*, 2016). Human studies shown the toxic lipid peroxides are known to cause membrane damage and reduce motility (BANSAL *et al.*, 2015; MAHA *et al.*, 2015). In this study, we sought to evaluate correlation between measured values of lipid peroxidation (TBARS) in blood and seminal plasma, thereby blood markers could be used as a possible analysis of the spermatic standard in horses.

As noted there is a strong correlation between measured values of lipid peroxidation (TBARS) in blood and seminal plasma (Figure 2). The blood analysis could reduce the handling of the semen, which is also an aggravating factor of spermatic damage (PALMER, 1984; VIDAMENT, et al. 2000). Reactive oxygen species can be one of the determinant factors of fertility reduction in horses (JOHANNISSON *et al.*, 2014). However, despite studies have demonstrated that peroxidative damage to the sperm cells by oxidative stress in the present study it was not observed significant changes in lipid peroxidation levels during the storage of cooled equine semen (Figure 3) or its correlation with progressive motility. This indicates that lipid peroxidation apparently is not a major factor influencing semen viability during storage at 5 C. Gibb *et al.*, (2014) argues that the relationship between stallion fertility and oxidative stress remains poorly understood. The relevance of oxidative stress to

stallion fertility assessments must be considered carefully, and that, while the symptoms of oxidative stress are never going to be beneficial, they may be indicative of an extremely fertile sample while remaining at subclinical levels. Furthermore, there is great variety of semen extenders and its effect may be significant in the diversity of results for the cooling and oxidative damage in semen (PADILLA; FOOTE 1991). Addition of semen extender increases the antioxidative/oxidative capacity of stallion seminal plasma (KANKOFER *et al.*, 2005; ASADPOUR *et al.*, 2012).

Stallion spermatozoa contain a high activity of the antioxidant scavenger, catalase, which is derived primarily from prostatic secretions (BALL *et al.*, 2000). During the estimated time, there was a trend to reduced activity levels of this antioxidant enzyme in the semen of stallions (Figure 4). This could make the spermatozoa more sensitive to oxidative damage. The beneficial effects of catalase on oxidative stress generated as a result of semen manipulation and cooling have been suggested by studies in various species (MICHAEL *et al.*, 2007; MAIA *et al.*, 2010; MCCARTHY; MEYERS, 2011; MOUBASHER *et al.*, 2013). The activity of catalase and superoxide dismutase presents a great variation among stallions in the activities of these scavengers. Sperm appear to have very limited amounts of ROS scavengers and seminal plasma is a potent source of ROS scavengers which functions to protect ejaculated equine sperm from the adverse effects of ROS (BALL *et al.*, 2000; BAUMBER; BALL, 2005). The removal of seminal plasma during semen processing may increase the susceptibility of sperm to oxidative stress because of the removal of these enzyme scavengers (PADILLA; FOOTE 1991; KANKOFER *et al.* 2005).

In conclusion, levels of plasma lipid peroxidation can be used as an indicative of seminal oxidative stress. Also, lipid peroxidation and the antioxidant enzyme catalase do not seem to be the major cause of loss and motility and consequently reduction in fertility in stallion semen during storage for 72h at 5⁰C. Extender used may have contributed to reduce the lipids oxidation and to keep antioxidative defense systems protecting the sperm from damage.

5. REFERENCE

- AITKEN, R. J; CLARKSON, J.S.; FISHEL, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. **Biology of reproduction**, v. 41, n. 1, p. 183-197, 1989.
- AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, n. 4, p. 659-668, 1995.
- AITKEN, R.J. et al. Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 2, p. 1-10, 2016.
- ASADPOUR, R; JAFARI, R; TAYEFI-NASRABADI, H. Effect of various levels of catalase antioxidant in semen extenders on lipid peroxidation and semen quality after the freeze-thawing bull semen. In: **Veterinary research forum**. 2012. p. 218-221.
- AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 89, n. 1, p. 65-75, 2005.
- BALL, B. A. et al. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 C. **Theriogenology**, v. 56, n. 4, p. 577-589, 2001.
- BANSAL, A. K. Antioxidants and Other Potent Strategies to Reduce Oxidative Stress in Semen. In: **Free Radicals in Human Health and Disease**. Springer India, 2015. p. 381-395.
- BAUMBER, J et al. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 24, n. 4, p. 621-628, 2003
- BAUMBER, J. et al. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. **Journal of andrology**, v. 21, n. 6, p. 895-902, 2000.
- DOS SANTOS HAMILTON, T.R. et al. Induced lipid peroxidation in ram sperm: semen profile, DNA fragmentation and antioxidant status. **Reproduction**, v. 151, n. 4, p. 379-390, 2016.
- FERRUSOLA, C.O. et al. 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, n. 1, p. 55-63, 2009.
- GIBB, Z.; LAMBOURNE, S. R.; AITKEN, R. J. The paradoxical relationship between stallion fertility and oxidative stress. **Biology of reproduction**, v. 91, n. 3, p. 77, 2014.

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

MAHAT, R. K. et al. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. **Int J Health Sci Res (IJHSR)**, v. 5, n. 3, p. 324-333, 2015.

MAIA, M. et al. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. **Animal reproduction science**, v. 122, n. 1, p. 118-123, 2010.

MICHAEL, A. et al. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 68, n. 2, p. 204-212, 2007.

MORRIS, L.H.; HUNTER, R. H.; ALLEN, W. R. Hysteroscopic insemination of small numbers of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 118, n. 1, p. 95-100, 2000.

MOUBASHER, A.E. et al. Catalase improves motility, vitality and DNA integrity of cryopreserved human spermatozoa. **Andrologia**, v. 45, n. 2, p. 135-139, 2013.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

PADILLA, A.W.; FOOTE, R. H. Extender and centrifugation effects on the motility patterns of slow-cooled stallion spermatozoa. **Journal of animal science**, v. 69, n. 8, p. 3308-3313, 1991.

PALMER, E. Factors affecting stallion semen survival and fertility. In: **10. international congress on animal reproduction and artificial insemination, University of Illinois at Urbana-Champaign, Illinois (USA), 10-14 Jun 1984**. University of Illinois at Urbana-Champaign, 1984.

RAO, B. et al. Lipid peroxidation in human spermatozoa as related to midpiece abnormalities and motility. **Gamete research**, v. 24, n. 2, p. 127-134, 1989.

VIDAMENT, M. et al. Centrifugation and addition of glycerol at 22 C instead of 4 C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 54, n. 6, p. 907-919, 2000.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal reproduction science**, v. 60, p. 481-492, 2000.

4 CONCLUSÕES

Observou-se uma forte correlação entre os valores medidos de peroxidação lipídica comparada a peroxidação no sangue e no plasma seminal, indicando que o plasma sanguíneo reflete o valor do seminal.

Não se observou correlação entre a peroxidação do plasma seminal e a motilidade progressiva, ou seja, o aumento da peroxidação lipídica não está relacionado com a morte de espermatozoides em nenhum dos grupos analisados.

Na avaliação dos grupos de 0, 24, 36 e 72 horas não ocorreu variação significativa de TBARS, sendo que o mesmo permaneceu estável, não ocorrendo peroxidação oxidativa, os espermatozoides não morreram por estresse oxidativo e sim por alguma outra causa desconhecida.

A catalase mostrou tendência a reduzir ($p = 0.065$) nos tempos analisados, não apresentando correlação entre catalase e a motilidade dos espermatozoides, a redução somente diminui a proteção contra a peroxidação de hidrogênio, não sendo essa a causa da morte dos espermatozoides.

O diluente utilizado pode ter contribuído para a redução da oxidação de lipídios e na manutenção do sistema de defesas antioxidantes que protegem os espermatozoides de possíveis danos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AITKEN, R.J. et al. Redox activity associated with the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 36, n. 8, p. 994-1010, 2004.

AITKEN, R.J.; BAKER, M.A. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 250, n. 1, p. 66-69, 2006.

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

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

AITKEN, R.J. et al. Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 2, p. 1-10, 2016.

ALMEIDA, J. L. **Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação do sêmen eqüino. 2006. 77f.** Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Ciências agrárias)-Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília.[Links].

ALMEIDA, J.L. **Efeito de diferentes concentrações de plasma seminal na criopreservação do sêmen equino.** 2010.

ALMEIDA, J; BALL, B.A. Effect of α -tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. **Animal reproduction science**, v. 87, n. 3, p. 321-337, 2005.

ALTHOUSE, G.C. et al. Characterization of lower temperature storage limitations of fresh-extended porcine semen. **Theriogenology**, v. 50, n. 4, p. 535-543, 1998.

ALVAREZ, C.A. et al. Efeito da suplementação de selenometionina e vitamina C sobre a morfopatologia espermática do sêmen de coelho. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 28, n. 2, p. 165-175, 2006.

AMANN RP, GRAHAM JK. Spermatozoal function. *In*: McKinnon AO, Voss JL (Ed.). **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.715-745.

AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. **Equine reproduction**, v. 1, p. 715-745, 1993.

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

ANANE, R.; CREPPY, E. E. Lipid peroxidation as pathway of aluminium cytotoxicity in human skin fibroblast cultures: prevention by superoxide dismutase+ catalase and vitamins E and C. **Human & experimental toxicology**, v. 20, n. 9, p. 477-481, 2001.

ANDRADE, E. R. et al. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 34, n. 2, p. 79-85, 2010.

ASADPOUR, Reza; JAFARI, Razi; TAYEFI-NASRABADI, Hossein. Effect of various levels of catalase antioxidante in semen extenders on lipid peroxidation and semen quality after the freeze-thawing bull semen. *In*: **Veterinary research fórum**. 2012. p. 218-221.

Formatado: Inglês (EUA)

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

AURICH, C. Recent advances in cooled-semen technology. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3, p. 268-275, 2008.

AURICH, J. E. **Effect of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen.--p. 185-192**. *En*: Theriogenology (USA).--Vol. 48, no. 2 (15 Jul. 1997), 2003.

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

BALL, B. A. et al. Effect of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 C. **Theriogenology**, v. 56, n. 4, p. 577-589, 2001.

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

- BANSAL, A.K. Antioxidants and Other Potent Strategies to Reduce Oxidative Stress in Semen. In: **Free Radicals in Human Health and Disease**. Springer India, 2015. p. 381-395.
- BAUMBER, J. et al. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 24, n. 4, p. 621-628, 2003.
- BAUMBER, J. et al. The effects of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. **Journal of andrology**, v. 21, n. 6, p. 895-902, 2000.
- BAUMBER, J.; BALL, B. A.; LINFOR, J.J. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. **American journal of veterinary research**, v. 66, n. 5, p. 772-779, 2005.
- BUSTAMANTE FILHO, I. C. Estresse oxidativo na criopreservação do sêmen equino. 2007.
- CHOW, C.K. Vitamin E and oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 11, n. 2, p. 215-232, 1991.
- COLENBRANDER, B. et al. Assessment of sperm cell membrane integrity in the horse. **Acta veterinaria Scandinavica. Supplementum**, v. 88, p. 49, 1992.
- DACHEUX, J.; GATTI, J.L.; DACHEUX, F. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. **Microscopy research and technique**, v. 61, n. 1, p. 7-17, 2003.
- DAWSON, E.B.; HARRIS, W.A.; POWELL, L.C. Relationship between ascorbic acid and male fertility. In: **Aspects of Some Vitamins, Minerals and Enzymes in Health and Disease**. Karger Publishers, 1990. p. 1-26.
- DOS SANTOS HAMILTON, Thais Rose et al. Induced lipid peroxidation in ram sperm: semen profile, DNA fragmentation and antioxidant status. **Reproduction**, v. 151, n. 4, p. 379-390, 2016.
- EDDY, E.M.; O'BRIEN, D.A. **The spermatozoon**. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. The physiology of reproduction. cap.2, p. 29-77. New York: Raven Press. 1994.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
- FERRUSOLA, C. Ortega et al. 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, n. 1, p. 55-63, 2009.

FRIDOVICH, I. Biological effects of the superoxide radical. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 247, n. 1, p. 1-11, 1986.

GIBB, Z; LAMBOURNE, S.R.; AITKEN, R.J. The paradoxical relationship between stallion fertility and oxidative stress. **Biology of reproduction**, v. 91, n. 3, p. 77, 2014.

GOMEZ, E.; IRVINE, D. S.; AITKEN, R. J. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxy-alkenals in human spermatozoa: Relationships with semen quality and sperm function. **International journal of andrology**, v. 21, n. 2, p. 81-94, 1998.

HAFEZ, ESE. Reprodução Animal. 6. ed. 1995

Formatado: Português (Brasil)

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press, USA, 2015.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition reviews**, v. 52, n. 8, p. 253-265, 1994.

JASKO, D. J. Produced for cooling and frozen storage of equine semen. **Ars Vet., Jaboticabal**, v. 10, p. 156-165, 1994.

KADIRVEL, G.; KUMAR, S; KUMARESAN, A. Lipid peroxidation, mitochondrial membrane potential and DNA integrity of spermatozoa in relation to intracellular reactive oxygen species in liquid and frozen-thawed buffalo semen. **Animal reproduction science**, v. 114, n. 1, p. 125-134, 2009.

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

KARESKOSKI, Maria; KATILA, Terttu. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. **Animal reproduction science**, v. 107, n. 3, p. 249-256, 2008.

KITAGAWA, Y. et al. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. **Theriogenology**, v. 62, n. 7, p. 1186-1197, 2004.

LEONHARD-MAREK, S. Influence of drugs, pollution and trace elements on male fertility. **Andrology in veterinary medicine, Stuttgart, Schattauer**, p. 474-481, 2001.

LEWIS, Sheena EM et al. Comparison of individual antioxidants of sperm and seminal plasma in fertile and infertile men. **Fertility and sterility**, v. 67, n. 1, p. 142-147, 1997.

LIMA, R.A. S; OLIVEIRA, R.A; MENDES, C.Q. Perfil e tendências da equideocultura brasileira. In: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 49, 2012, Brasília. Anais...Brasília, 2012.

LIVRES, RADICAIS. O papel da vitamina E na nutrição e reprodução animal-meios de defesa contra os radicais livres. **Revista Eletrônica Nutritime**, v. 4, n. 3, p. 456-461, 2007.

LUCK, M. L. The gonadal extracellular matrix. **Oxford Reviews of Reproductive Biology**, 1994.

MAHAT, Roshan Kumar et al. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. **Int J Health Sci Res (IJHSR)**, v. 5, n. 3, p. 324-333, 2015.

MAIA, M. S. Viabilidade espermática e geração de metabólicos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de lauril de sódio (OE), trolox-C e catalase. 2006.

MAIA, M. et al. Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. **Animal reproduction Science**, v. 122, n. 1, p. 118-123, 2010.

MAKKER, K.; AGARWAL, A.; SHARMA, R. **Oxidative stress & male infertility**. 2009.

MARENGO, S.R. Maturing the sperm: unique mechanisms for modifying integral proteins in the sperm plasma membrane. **Animal reproduction science**, v. 105, n. 1, p. 52-63, 2008.

MCDOWELL, K.J. et al. Characterisation of proteins in the seminal plasma of stallions, geldings and geldings supplemented with testosterone. **Research in veterinary science**, v. 61, n. 1, p. 33-37, 1996.

MICHAEL, A. et al. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 68, n. 2, p. 204-212. 2007.

MORAN, D. M. et al. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 38, n. 6, p. 999-1012, 1992.

MORAN, D. M. et al. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 38, n. 6, p. 999-1012, 1992.

MORRIS, L. H.; HUNTER, R. H.; ALLEN, W. R. Hysteroscopic insemination of small numbers of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 118, n. 1, p. 95-100, 2000.

MOUBASHER, A.E. et al. Catalase improves motility, vitality and DNA integrity of cryopreserved human spermatozoa. **Andrologia**, v. 45, n. 2, p. 135-139, 2013.

NAIR, S. J. et al. A comparative study on lipid peroxidation, activities of antioxidant enzymes and viability of cattle and buffalo bull spermatozoa during storage at refrigeration temperature. **Animal reproduction science**, v. 96, n. 1, p. 21-29, 2006.

NORDBERG, J; ARNER, ESJ. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free radical biology and medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

OLSON, S. E.; SEIDEL, G. E. Culture of in vitro-produced bovine embryos with vitamin E improves development in vitro and after transfer to recipients. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 2, p. 248-252, 2000.

PADILLA, A. W.; FOOTE, R. H. Extender and centrifugation effects on the motility patterns of slow-cooled stallion spermatozoa. **Journal of animal science**, v. 69, n. 8, p. 3308-3313, 1991.

PALMER, E. Factors affecting stallion semen survival and fertility. In: **10. international congress on animal reproduction and artificial insemination, University of Illinois at Urbana-Champaign, Illinois (USA), 10-14 Jun 1984**. University of Illinois at Urbana-Champaign, 1984.

PETRUNKINA, A.M. Fundamental aspects of gamete cryobiology. **Journal für Reproduktionsmedizin und Endokrinologie-Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology**, v. 4, n. 2, p. 78-91, 2007.

PICKETT BW, AMANN RP. Cryopreservation of semen. In: MCKINNON, A.O, VOSS J.L (Ed.). **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, p.769-789, 1993.

RAO, B. et al. Lipid peroxidation in human spermatozoa as relatd to midpiece abnormalities and motility. **Gamete research**, v. 24, n. 2, p. 127-134, 1989.

RIGBY, S.L. et al. Advances in cooled semen technologies: seminal plasma and semen extender. **Animal reproduction science**, v. 68, n. 3, p. 171-180, 2001.

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, n. 4, p. 312-318, 2003.

SALEH, R.A.; HCLD, ASHOK AGARWAL. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 6, p. 737-752, 2002.

SAMPER, J.C. Equine breeding management and artificial insemination. Philadelphia: **W.B. Saunders**, p. 306, 2000.

SAMPER, J. C.; MORRIS, C. A. Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. **Theriogenology**, v. 49, n. 5, p. 895-903, 1998.

SHARMA, R.K. et al. The reactive oxygen species—total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. **Human Reproduction**, v. 14, n. 11, p. 2801-2807, 1999.

SHARMA, R.K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, v. 48, n. 6, p. 835-850, 1996.

SQUIRES, E.L. et al. Effect of sperm number and frequency of insemination on fertility of mares inseminated with cooled semen. **Theriogenology**, v. 49, n. 4, p. 743-749, 1998.

STRYER L. Introdução ao estudo das membranas biológicas. In: STRYER L. **Bioquímica**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. p.230-256.

TROEDSSON, M.H.T. et al. Components in seminal plasma regulating sperm transport and elimination. **Animal reproduction science**, v. 89, n. 1, p. 171-186, 2005.

TURNER, R. M. O.; MCDONNELL, S. M. Alkaline phosphatase in stallion semen: characterization and clinical applications. **Theriogenology**, v. 60, n. 1, p. 1-10, 2003.

TWIGG, J. et al. Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma. **Molecular Human Reproduction**, v. 4, n. 5, p. 439-445, 1998.

URICH, J.E.; KUHNE, A.; HOPPE, H.; AURICH, C. **Seminal plasma affects membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation. Theriogenology** 1996;46:791-797.

VIDAMENT, M. et al. Centrifugation and addition of glycerol at 22 C instead of 4 C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 54, n. 6, p. 907-919, 2000.

_____. Equine frozen semen: freezability and fertility field results. **Theriogenology**, v. 48, n. 6, p. 907-917, 1997.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal reproduction science**, v. 60, p. 481-492, 2000.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. *Meth. Enzymol*, Nova York, v. 77, p. 325-332, 1981.

WITE, I. G. Secreções do trato reprodutivo masculino e plasma seminal. **Reprodução animal**. 4. ed. São Paulo: Manole. p. 212-228, 1988.

Formatado: Português (Brasil)

WONG, W.Y. et al. The impact of calcium, magnesium, zinc, and copper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. **Reproductive toxicology**, v. 15, n. 2, p. 131-136, 2001.

YOUSEF, M.I. et al. Study of the protective effect of ascorbic acid against the toxicity of stannous chloride on oxidative damage, antioxidant enzymes and biochemical parameters in rabbits. **Toxicology**, v. 235, n. 3, p. 194-202, 2007.