

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR DE GARANHÕES COM
ÓLEO DE ARROZ CONTENDO GAMMA-ORYZANOL NA QUALIDADE
ESPERMÁTICA**

TAMARINI RODRIGUES ARLAS

PORTO ALEGRE

Agosto de 2008

A723e Arlas, Tamarini Rodrigues

Efeito da suplementação alimentar de garanhões com óleo de arroz contendo gamma-oryzanol na qualidade espermática / Tamarini Rodrigues Arlas - Porto Alegre: UFRGS, 2008.

53 f.; il. – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2008. Rodrigo Costa Mattos, Orient.

1. Garanhões 2. Sêmen 3. Antioxidantes 4. Ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) I. Mattos, Rodrigo Costa, Orient. II. Título

CDD 619.38

Catálogo na fonte preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Veterinária da UFRGS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR DE GARANHÕES COM
ÓLEO DE ARROZ CONTENDO GAMMA-ORYZANOL NA QUALIDADE
ESPERMÁTICA

Autor: Tamarini Rodrigues Arlas
Dissertação apresentada como
requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre em Ciências
Veterinárias na área de Reprodução
Animal
Orientador: Rodrigo Costa Mattos

TAMARINI RODRIGUES ARLAS
PORTO ALEGRE
Agosto de 2008

“Saudade... já não sei se é a palavra certa para usar,
Ainda lembro do seu jeito.”

Chimarruts

Agradecimentos

A minha mãe, pela dedicação e apoio nos momentos difíceis. Tudo que sou hoje devo exclusivamente a ti, te amo muito.

Ao meu orientador e amigo, Rodrigo Costa Mattos, pela paciência, ajuda e ensinamentos.

Á todos os estagiários do Laboratório de Reprodução Animal-UFRGS (REPROLAB), que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho, em especial a Fabiana Castro.

Ao Luciano, pela compreensão e muita paciência.

As minhas grandes amigas, Maria Carolina, Larissa, Elisana, Marília, em especial a Paula, pela ajuda do início ao fim.

Á Carolina, do departamento de Bioquímica-UFRGS- Laboratório 36, pela grande ajuda com minhas amostras.

Ao casal, Enio e Cristina, inúmeros agradecimentos.

Ao Eduardo Malschitzky, pela ajuda nas correções.

Por fim, a todos meus amigos, obrigada.

Resumo

Efeito da suplementação alimentar dos garanhões com óleo de arroz contendo gama-oryzanol na qualidade espermática

Autor: Tamarini Rodrigues Arlas

Orientador: Rodrigo Costa Mattos

Co-orientador: Ricardo Gregory

Os Triglicerídeos são essenciais para o metabolismo espermático e um alto nível deste está associado com boa qualidade do sêmen. O nível de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) é considerado um elemento crítico para a capacitação espermática e está associada à motilidade espermática e com maior fluidez de membrana. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da alimentação suplementar de garanhões, com óleo de arroz comercial (Gama-Horse, HT Nutri ®, Brasil), em parâmetros espermáticos. Quatro garanhões com idades variando entre 6 e 30 anos foram utilizados. Os animais tiveram o mesmo manejo durante os 190 dias de tratamento. O experimento foi dividido em três períodos: pré-tratamento (PT) - 30 dias para a estabilização das reservas espermáticas; tratamento (TR) - 80 dias de suplementação com 200 ml de óleo arroz contendo 34% ácido linolêico, 1% ácido linolênico, 1% gama-oryzanol e 660mg/Kg vitamina E; controle (CN) - 80 dias sem suplementação de óleo de arroz. Ejaculados foram coletados duas vezes por semana com uma vagina artificial. As avaliações do sêmen foram realizadas imediatamente após a colheita, sendo avaliados volume, concentração, motilidade total, funcionalidade (HOST) e integridade (CFDA / PI) da membrana e potencial antioxidante total (TRAP). Uma amostra de sangue foi obtida cada 15 dias para avaliar testosterona e estradiol plasmáticos. Para avaliar o efeito da suplementação de óleo de arroz no sêmen os dados dos últimos 20 dias a partir da TR com os últimos 20 dias a partir da CN foram analisados com ANOVA, com uma significância estatística de $P < 0,05$. A suplementação do óleo de arroz aumentou a concentração ($P < 0,01$) (TR: $226 \times 10^6/\text{mL}$; NC: $172 \times 10^6/\text{mL}$), motilidade total ($P < 0,01$) (TR: 59%; NC: 42%), HOST ($P < 0,02$) (TR: 73%; NC: 69%) e TRAP ($P < 0,01$) (TR: 1,9 nmol Trolox / mg de proteína; CN: 0,98 nmol Trolox / mg de proteína). Não foram observadas diferenças entre os períodos TR e CN em volume, integridade de membrana, testosterona e estradiol. A suplementação oral com o óleo de arroz

comercial contendo PUFA e gama-oryzanol aumentou o potencial antioxidante total do sêmen. Além disso, foi detectado uma maior funcionalidade de membrana, provavelmente devido a defesa antioxidante evitando peroxidação lipídica da membrana espermática ou a uma melhoria da fluidez da membrana.

Effect of supplemental feeding of stallions with rice oil containing gamma-oryzanol in sperm quality

Author: Tamarini Rodrigues Arlas

Adviser: Rodrigo Costa Mattos

Co-adviser: Ricardo Macedo Gregory

Abstract

Triglycerides are essential for sperm metabolism and a high level of triglycerides is associated with good semen quality. The level of polyunsaturated fatty acids (PUFA) is considered a critical feature for capacitation and is associated with sperm motility and with increased membrane fluidity. The aim of this experiment was to evaluate the effects of the supplementary feeding of stallions, with commercial rice oil (Gama-Horse, HT Nutri[®], Brazil), on sperm parameters. Four stallions with ages ranging between 6 and 30 years were used. The animals had the same management during the 190 days of trial. The experiment was divided in three periods: pre-treatment (PT) - 30 days to sperm reserves stabilization; treatment (TR) - 80 days supplementation with 200 mL rice oil containing 34% linoleic acid, 1% linolenic acid, 1% gamma oryzanol and 660mg/Kg vitamin E; control (CN) - 80 days without rice oil supplementation. Ejaculates were collected twice a week with an artificial vagina. Semen exams were performed immediately after collection, being evaluated volume, concentration, total motility, functionality (HOST) and integrity (CFDA/PI) of membrane and total antioxidant potential (TRAP). A blood sample was obtained each 15 days to evaluate plasma testosterone and estradiol. To evaluate the effect of the rice oil supplementation the semen data from the last 20 days from TR with the last 20 days from CN were analyzed with ANOVA, with a statistical significance from 0.05. The supplementation of rice oil increased concentration ($P < 0.01$) (TR: 226×10^6 /mL; CN: 172×10^6 /mL), total motility ($P < 0.01$) (TR: 59%; CN: 42%), HOST ($P < 0.02$) (TR: 73%; CN: 69%) and TRAP ($P < 0.01$) (TR: 1.9 nmol Trolox/mg of protein; CN: 0.98 nmol Trolox/mg of protein). No differences among periods TR and CN were observed in volume, membrane integrity, testosterone and estradiol. Oral supplementation with the commercial rice oil containing PUFA and gamma-oryzanol increased the total antioxidant potential of the semen. In addition, a higher membrane functionality and

motility was detected, probably due to antioxidant protection avoiding lipid peroxidation of sperm membrane or to a improved membrane fluidity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema gráfico da suplementação dos garanhões durante as três fases do experimento: PT - Pré Tratamento; TR – Suplementação; CN – Controle.....	33
Figura 2. Valores de testosterona circulante nos quatro garanhões durante os 20 dias finais do período TR (tratamento) e do período CN (Controle).....	38
Figura 3. Valores médios de TRAP dos garanhões nos períodos pré-tratamento (PT) amostras 1 a 3, tratamento (TR) amostras 4 a 9 e controle (CN) amostras 10 a 15. ($P = 0,01$).....	39
Figura 4. Valores médios de TRAP do sêmen dos garanhões durante o período PT e nos últimos 20 dias dos períodos TR e CN.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores das médias, desvio padrão e <i>P</i> do sêmen fresco durante os 20 dias finais dos períodos TR e NC.....	37
Tabela 2. Valores das médias, desvio padrão e <i>P</i> do sêmen preservado por 24 horas a + 5°C nos 20 dias finais dos períodos tratamento (TR) e controle (CN).....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

α - alfa

μm – micrometros

$^{\circ}\text{C}$ – graus Celsius

μL - microlitros

ABAP - 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropane)

AGE – ácidos graxos essenciais

ANOVA – análise de variância

CASA – análise espermática assistida por computador

CFDA – diacetato de carboxifluoresceína

Cl^- - cloreto

CN - Controle

DNA – ácido desoxirribonucléico

g – grama

H_2O_2 - peróxido de hidrogênio

HCO_3^- - bicarbonato

HOST – teste hiposmótico

Kg – kilograma

ML – mililitros

mM - milimolar

MOsmol – miliosmol

Na^+ - sódio

nmol - milimol

NTE – número total de espermatozoides

O^{\bullet} - radical superóxido

OH^{\bullet} - radical hidroxila

PGE – prostaglandina

PI – iodeto de propídeo

Ppm – parte por milhão

PT - Pré Tratamento

PUFAs - ácidos graxos poliinsaturados

RO^{\bullet} – radical alcóxil

RO_2^\bullet – radical peroxil

ROS - espécies reativas de oxigênio

TR – Suplementação

TROLOX - análogo hidrossolúvel do α -tocopherol, usado como padrão

β - beta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 O espermatozóide.....	16
2.2 Membrana plasmática.....	16
2.3 Avaliação do sêmen.....	18
2.3.1 Motilidade espermática.....	18
2.3.2 Morfologia espermática.....	19
2.3.3 Teste de funcionalidade de membrana – Teste hiposmótico (HOST).....	20
2.3.4 Integridade de membrana – Diacetato de Carboxifluosceína (CFDA) e iodeto de propídio (PI).....	22
2.4 Ácidos graxos.....	22
2.4.1 O colesterol como precursor de hormônios esteroidais.....	24
2.4.2 Prostaglandinas.....	25
2.5 Antioxidantes.....	25
2.6 Radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS).....	26
3 ARTIGO	28
4 CONCLUSÃO	44
REFERÊNCIAS.....	45

1 – INTRODUÇÃO

A inseminação artificial é uma técnica bastante difundida e corrente em reprodução equina. Há relatos de inseminação artificial com sêmen fresco em textos árabes do século XIV, sendo que sua popularização ocorreu a partir do final do século XIX (BRISKO & VARNER, 1992). Os programas de inseminação artificial permitem o uso mais eficiente do sêmen do garanhão (BROWN & BERTONE, 2002).

As espécies reativas de oxigênio (ROS), também conhecidas como radicais livres, são íons de oxigênio diatômicos gerados através de sistemas biológicos aeróbicos ou parcialmente aeróbicos. O desemparelhamento de elétrons, situação energeticamente instável, é o que confere alta reatividade a estas moléculas (SHARMA & AGARWAL, 1996).

Nos últimos anos, clínicos e cientistas têm ampliado seus conhecimentos sobre a importância do estresse oxidativo no sêmen. Estudos recentes indicaram que ROS é uma regra importante na função do sêmen normal e o desbalanço na produção ou degradação da ROS podem ocasionar sérios efeitos adversos no sêmen. Espécies oxigênio reativas podem ser geradas durante o metabolismo oxidativo e o aumento da geração de ROS também tem sido atribuído ao espermatozóide danificado e anormal (MEYERS, 2007).

O papel das espécies reativas de oxigênio (ROS) tem sido enfatizado na fisiologia da reprodução. Vários estudos têm demonstrado que os espermatozoides são capazes de produzir quantidades controladas de ROS endógeno, com o objetivo de induzir a capacitação espermática e a reação acrossomal, promovendo sua habilidade fertilizante (De LAMIRANDE & GAGNON, 1995; RIVLIN et al., 2004).

Sob condições oxidativas extremas, todos os componentes celulares, incluindo lipídios, proteínas, ácidos nucléicos e açúcares, são alvos potenciais de dano oxidativo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). A gravidade das lesões depende da natureza e da quantidade de ROS e do momento e duração de exposição, estando ainda associada a fatores extracelulares como temperatura, tensão de oxigênio e ambiente (AGARWAL et al., 2003), que pode resultar em morte celular via apoptose ou necrose (SHARMA et al., 1999).

Nos lipídios de membrana, os radicais livres podem promover lipoperoxidação, reagindo também com as proteínas de superfície, alterando as características de fluidez

e levando, assim, à liberação de subprodutos potencialmente tóxicos. As conseqüências diretas dessas lesões serão observadas na morfologia e funcionalidade do espermatozóide. Alterações como peroxidação da membrana lipídica (BALL & VO, 2002), inibição do metabolismo (WANG et al., 2003), da motilidade (JONES et al., 1979) e da capacidade fertilizante (PASQUALOTTO et al., 2000; AGARWAL & SAID, 2005) já foram relacionadas com a alta concentração de ROS no sêmen.

A possível explicação para a alta susceptibilidade do espermatozóide ao estresse oxidativo, baseia-se no fato de que, em mamíferos, as membranas espermáticas são ricas em ácidos graxos poliinsaturados tornando-as muito fluidas e, ao mesmo tempo, muito vulneráveis a danos peroxidativos (DE LAMIRADE & GAGNON, 1995; SIKKA, 2004).

Devido ao sêmen equino conter uma quantidade relativamente alta de ácidos graxos poliinsaturados, sua susceptibilidade aos danos oxidativos é aumentada. A peroxidação lipídica causada por ROS resulta em decréscimo da fluidez da membrana – um parâmetro que é essencial para o espermatozóide, para as funções fusogênicas das reações do acrossomo e fusão do espermatozóide à membrana plasmática do oócito durante a fertilização, assim como a motilidade e resistência ao estresse térmico e osmótico. (MEYERS, 2007).

Outra explicação para essa fragilidade é que durante os estágios finais da espermatogênese esses gametas descartam grande parte do seu citoplasma, eliminando enzimas citoplasmáticas de defesa que protegem as células somáticas de danos oxidativos (GRIVEAU & LE LANNOU, 1997). Por conseguinte, a capacidade de reparar o DNA também é perdida, tornando-os mais vulneráveis a danos do que qualquer outra célula (AGARWAL & SAID, 2005).

O óleo de arroz e seus principais componentes (ácidos graxos não saturados, fitosteróis, tocotrienóis e α tocoferol) têm demonstrado capacidade em aumentar os lipídios plasmáticos de roedores, coelhos, primatas e humanos, reduzindo o colesterol plasmático e as concentrações de triglicerídeos. Outras propriedades potenciais do óleo de arroz e do gama-oryzanol, verificados *in vitro* e em modelos animais, incluem a modulação da secreção da hipófise, inibição da secreção gástrica, inibição da agregação plaquetária e ação antioxidante (CÍCERO & GADDI, 2001).

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da suplementação alimentar de óleo de arroz na motilidade espermática total e progressiva; concentração espermática;

morfologia espermática; integridade e funcionalidade de membrana e capacidade antioxidante total do sêmen.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O espermatozóide

A célula espermática eqüina, como em outros mamíferos é altamente especializada constituída de cabeça, peça intermediária, peça principal ou cauda. A borda posterior da cabeça da célula e a peça intermediária são unidas na região do colo, que é uma estrutura altamente especializada. A cabeça do espermatozóide eqüino é achatada, em forma de raquete, a célula espermática tem dimensão de aproximadamente 60-65 μm em todo o seu comprimento; a cabeça com comprimento de 6 a 7 μm , peça intermediária 10 μm , peça principal 40 μm e porção terminal 4 a 5 μm . A cabeça do espermatozóide tem aproximadamente 3,5 a 4,0 μm de largura no seguimento equatorial do acrossomo. A função normal da célula é essencial durante o transporte do gameta no macho e na fêmea e reflete criticamente na função de coordenação de várias organelas celulares (MEYERS, 2000).

Toda a característica estrutural especializada do espermatozóide está voltada para a sua atividade funcional única, ou seja, assegurar a liberação do material genético contido no núcleo do espermatozóide para o oócito, onde a união dos pronúcleos masculino e feminino ocorre, produzindo o zigoto (EDDY & O' BRIEN, 1994). Assim sendo, a função principal da cabeça do espermatozóide é a liberação de uma série haplóide de cromossomos para o oócito; enquanto, a do flagelo é promover motilidade à célula para permitir sua passagem pelo trato reprodutivo feminino e a penetração através da zona pelúcida do oócito (MORTIMER, 1997).

2.2 Membrana Plasmática

Toda a célula espermática é coberta por uma membrana plasmática, que é uma camada dupla de fosfolipídio incorporando colesterol, carboidratos e proteínas. Colesterol serve como uma substância estabilizadora de membrana. Algumas das proteínas são embebidas dentro das camadas de lipídios em extensões variadas, mas outras estão localizadas fora da camada lipídica e são associadas ao glicocalix. Algumas proteínas são descritas como tendo a capacidade de atravessar a camada dupla de lipídio pelos canais de íons, poros, receptores, e componentes de transdução de sinal. Proteínas

que funcionam como receptoras para vários hormônios e componentes da matriz extracelular estão localizadas fora da camada lipídica e glicocalix. As proteínas compõem 50% do peso molecular da membrana. As membranas plasmáticas parecem estar ligadas nas estruturas mais internas na região do acrossoma, região pós acrossomal e região do colo (MEYERS, 2000).

A membrana plasmática é formada por duas camadas lipídicas, contendo moléculas de fosfolipídios polares, distribuídos assimetricamente, todas orientadas de maneira que a porção hidrofóbica fique direcionada para o centro da membrana e a porção hidrofílica para a superfície da membrana. Os principais lipídeos presentes nesta estrutura celular são fosfolipídeos como, colina, serina, glicerol e inositol, glicoesfingolipídeos e esteróides. Os espermatozóides na espécie eqüina possuem uma composição incomum de organização de lipídeos na membrana plasmática. Esta é repleta de fosfolipídeos poliinsaturados que podem compensar perdas de colesterol. Os fosfolipídeos poliinsaturados são mais flexíveis que os saturados e podem, portanto, manter a dinâmica característica de bicamada lipídica desta membrana (FLESCH & GADELLA, 2000).

À temperatura corpórea, a membrana plasmática apresenta-se na forma de um mosaico fluido onde as proteínas estão livres para moverem-se entre os fosfolipídios bilaterais, uma vez que a própria função requer que as proteínas estejam aptas para moverem-se dentro da membrana (JASKO, 1994), o que a torna uma estrutura extremamente dinâmica (GADELLA et al., 2001).

Os principais fatores que afetam esta fluidez são a composição relativa entre fosfolipídios e colesterol e a temperatura à qual a membrana é exposta (HAMMERSTEDT et al., 1990). A manutenção do estado líquido dos lipídeos e das proteínas da membrana permite a movimentação livre dos componentes, o que garante suas interações (HAMMERSTEDT et al., 1990; FLESCH & GADELLA, 2000); ou seja, lipídeo-lipídeo, lipídeo-proteína. Essas interações são a base para ordenar os domínios na membrana, resultando na compartimentalização da membrana plasmática; e a manutenção desses domínios é essencial para a funcionalidade espermática (PARKS & GRAHAM, 1992).

A membrana plasmática dos espermatozóides de mamíferos tem uma pronunciada organização de domínios com muitos antígenos glicoprotéicos (WOLFE et al. 1998). A membrana plasmática envolve a cabeça do espermatozóide e tem sido subdividida em domínio de superfície especializada, notavelmente a região do acrossoma e pós

acrossoma. Na região do acrossoma a porção anterior tem sido descrita como *seguimento marginal* e inclui a borda periférica da célula e fica sobre o *seguimento principal*, que é a maior área acrossomal. A parte posterior do acrossoma é chamada de *seguimento equatorial* e é a área na qual a zona pelúcida é iniciada durante os primeiros estágios da fertilização. Os domínios do seguimento marginal, principal, e equatorial constam do que é freqüentemente chamado *cap. Acrossomal*. A região pós acrossomal da membrana plasmática é a região entre a margem posterior do seguimento equatorial do acrossoma e o colo da célula espermática. Na junção do colo e peça intermediária está o anel posterior, que provavelmente forma um selo firme entre os compartimentos citoplasmáticos da cabeça e cauda do espermatozóide (MEYERS, 2000).

2.3 Avaliação do Sêmen

A avaliação do sêmen deve ser rápida e eficiente de modo que as amostras cuidadosamente coletadas possam ser processadas preservando a qualidade inicial e fertilidade (HAFEZ, 1995).

2.3.1 Motilidade Espermática

A determinação da motilidade espermática envolve estimativa subjetiva da viabilidade dos espermatozoides e da qualidade da motilidade. A análise ao microscópio óptico é a mais comumente utilizada. Esta é realizada no sêmen fresco e no diluído (HAFEZ, 2007).

A avaliação da motilidade espermática consiste na determinação da percentagem de espermatozoides totais com movimento em um ejaculado. Para se obter uma avaliação mais precisa, pode-se avaliar apenas a percentagem de espermatozoides com motilidade progressiva, já que a estes é atribuída alta fertilidade (PICKETT & VOSS, 1972).

Entende-se por motilidade progressiva a percentagem de células que estão se movimentando ativamente para frente. Incluem-se, também, os espermatozoides com movimentos circulares amplos, devido à alta incidência de implantações abaxiais do colo (BIELANSKI & KACZMARSKI, 1979). A motilidade total é definida como a percentagem de espermatozoides que apresentam movimento circular, pendular, progressivo. A motilidade espermática é um dos principais métodos de avaliação de espermatozoides preservados e constitui um elemento importante na estimativa da

viabilidade espermática (KENNEY et al., 1983, VARNER et al., 1989; PICKETT, 1993). Sendo ela um componente indispensável no mecanismo de fertilização, sua perda irreversível resultaria na perda da função celular. Por outro lado, sua manutenção não implica integridade celular completa (VARNER et al., 1989) e não tem correlação absoluta com a fertilidade (PACE & SULLIVAN, 1975; BEDFORD et al., 1995; MATTOS, 1995; KELLER, 1998).

Várias técnicas foram desenvolvidas para uma avaliação objetiva da motilidade espermática: fotomicrografia com lapso de tempo, videomicrografia quadro a quadro, espectrofotometria e análise computadorizada. Sistemas automáticos são acurados, mas seus custos relativamente altos limitam o uso rotineiro em laboratórios comerciais (HAFEZ, 2007).

Análise Espermática Assistida por Computador (CASA) é adequado para determinar clinicamente os padrões individuais de motilidade (AMANN, 1987; JASKO et al., 1988; BLACH et al., 1989). Este método é visto como um importante avanço na avaliação da qualidade espermática (YÁNIZ et al., 2008).

A avaliação da motilidade e morfologia da célula espermática é um parâmetro essencial para o estabelecimento de correlação entre motilidade e fertilidade espermática. A CASA permite uma avaliação objetiva das diferentes características das células espermáticas, como motilidade, velocidade e morfologia. O principal problema quanto a CASA está relacionado à padronização e otimização dos equipamentos, procedimentos e competência do usuário. Os diferentes instrumentos utilizados têm demonstrado altos níveis de precisão quanto à classificação espermática utilizando diferentes metodologias (VERSTEGEN et al., 2002).

Jasko et al. (1992), ao avaliarem a correlação entre diversas características seminais e fertilidade de garanhões, observaram que o coeficiente mais alto foi o obtido com a motilidade avaliada subjetivamente ($r = 0.46$). A motilidade estimada por computador teve $r = 0.34$.

2.3.2 Morfologia Espermática

A forma do espermatozóide pode ser alterada durante vários estágios de sua vida e as causas destas deformidades podem agir num estágio específico do desenvolvimento espermático, ou ocorrer durante o transporte, após sua maturidade. As possíveis causas

destas alterações podem estar presentes na espermatogênese, na maturação do gameta, durante e após a ejaculação (DOTT, 1975).

A avaliação isolada da morfologia espermática pode não indicar o potencial de fertilidade de um ejaculado, mas pode mostrar se o potencial de fertilidade é baixo, principalmente quando houver altas porcentagens de anormalidades espermáticas primárias e secundárias (DOTT, 1975).

As alterações morfológicas do espermatozóide eqüino podem se dividir em primárias e secundárias (BLOM, 1949). As alterações primárias ocorrem durante o processo de espermatogênese e as alterações secundárias ocorrem durante o percurso pelos ductos, epidídimo e durante a ejaculação. Esta classificação tem sido questionada, pois a origem destas alterações ainda não foi bem esclarecida (BLOM, 1972).

Pelo menos 200 espermatozóides devem ser avaliados, considerando-se a presença do tipo e a incidência de cada defeito morfológico. Defeitos específicos devem ser registrados, como acrossomos *knobbed*, gotas protoplasmáticas proximais, peças intermediárias inchadas e caudas enroladas (HAFEZ, 2007).

De acordo com Bielanski (1975), a presença de mais de 10% de anormalidades primárias no garanhão, está relacionada à baixa fertilidade, enquanto garanhões apresentando somente anormalidades secundárias, mesmo superando 30% de alterações em um ejaculado, não apresentam necessariamente baixa fertilidade.

2.3.3 Teste de Funcionalidade de Membrana - Teste Hiposmótico (HOST)

As membranas biológicas são responsáveis pela homeostase celular, por meio das trocas realizadas com o meio externo. A membrana forma uma barreira semipermeável para moléculas e serve para manter e modular a composição do meio intracelular. Além disso, a membrana protege a célula contra as influências do ambiente extracelular, tanto no trato genital masculino, até os espermatozóides serem ejaculados, como no trato genital feminino até ocorrer à fertilização. Protege também de influências não fisiológicas, quando os espermatozóides são colocados nos diluentes seminais (EINARSSON, 1992).

A integridade da membrana também é importante no processo de capacitação espermática. Sabendo-se que a membrana plasmática está envolvida em trocas metabólicas com o meio, o estudo de sua funcionalidade soma-se aos parâmetros tradicionais de avaliação do sêmen para determinar índices de fertilidade. Além das diferenças individuais na preservação do sêmen de garanhões, pode-se considerar que o

comportamento osmótico do espermatozóide também tem influência na preservação do sêmen (LAGARES, 1995; KOHNE et al., 1995). A integridade funcional e estrutural da membrana espermática é crucial para a viabilidade dos espermatozóides (LECHNIAK et al., 2002).

O teste hiposmótico (HOST) foi desenvolvido por Jeyendran et al. (1984), com a finalidade de avaliar a funcionalidade da membrana plasmática em espermatozóides humanos.

Este teste tem sido usado para responsividade da membrana espermática para uma variedade de espécies, incluindo carneiro, humano, bovino e garanhão e tem sido relacionado à função do sêmen e subfertilidade. O princípio é baseado no transporte de água através da membrana da cauda do espermatozóide sob condição hipotônica. Quando os mecanismos de transporte celular de água são adequados, a água flui de acordo com o gradiente de concentração e causa uma protuberância da membrana plasmática sobre a cauda do espermatozóide. A cauda do espermatozóide desenvolve uma característica distal enrolada, a população de células pode ser contada manualmente ou automaticamente. Esta medida fundamental é simples de ser realizada e poderia ganhar mais aplicação clínica para maior conhecimento do transporte de água disponível do sêmen do garanhão (MEYERS, 2007). Assim, a capacidade do enrolamento do espermatozóide na presença de solução hiposmótica demonstra que está ocorrendo transporte de água através da membrana, indicando função intacta da membrana (DREVIUS & ERIKSSON, 1966).

Lagares et al. (2000) modificaram a técnica desenvolvida por Lomeo & Giambérsio (1991), diluindo sêmen equino com água destilada na proporção de 1:3 (100 mOsmol/kg), com o objetivo de verificar o efeito de quatro diluentes para o sêmen equino resfriado. Observaram altos percentuais de espermatozóides com membrana funcional ao utilizar os diluentes Leite Desnatado, diluente Kenney, diluente Tyrode e o diluente Glicina.

2.3.4 Integridade de Membrana - Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA) e Iodeto de Propídio (PI)

As técnicas que utilizam corantes fluorescentes vem ganhando importância por sua característica de marcar estruturas específicas das células e de detectar integridade estrutural ou funcionalidade de forma clara (CELEGHINI, 2005).

Garner et al. (1986) descreveram a utilização de duas colorações fluorescentes, em conjunto ou separadamente, para avaliar a integridade da membrana plasmática de suínos, bovinos, caninos, eqüinos, camundongos e humanos: a carboxifluoresceína (CFDA) e o iodeto de propídio (PI).

O espermatozóide é corado de verde pelo CFDA, através de esterases não específicas, que se transformam em carboxifluoresceína livre no interior da célula, ficando esta retida (HARRISON & VICKERS, 1990) nos espermatozóides com membrana íntegra (HAUGLAND, 1992). O PI cora as células mortas de vermelho, devido à permeabilidade alterada da membrana danificada (JOHNSON et al., 1996). A utilização conjunta do CFDA com o PI é considerada mais segura para avaliar a integridade de membrana do que a utilização isolada destes corantes (HARRISON & VICKERS, 1990). Quando utilizados separadamente, o PI é considerado mais confiável do que o CFDA (BALTES, 1993).

Esta técnica tem como desvantagem a necessidade de ser realizada o mais rápido possível depois da aplicação do corante, pois a cor se perde devido à passagem dos compostos fluorescentes através da membrana (JOHNSON et al., 1996).

2.4 Ácidos graxos

Os ácidos graxos são fisiologicamente importantes, tanto como componentes de fosfolípidios e glicolípídeos, como moléculas alimentares. São armazenados no tecido adiposo como tricilgliceróis (gorduras neutras), que podem ser mobilizados pela ação hidrolítica de lípases sob controle hormonal (STRYER, 1992).

Ácidos graxos são ácidos carboxílicos alifáticos de cadeias longas, encontrados em lípidios e óleos naturais. Podem ou não apresentar ligações duplas entre as moléculas de carbono, sendo classificados como: saturados e insaturados. Os ácidos graxos saturados (nenhuma ligação dupla), são encontrados principalmente em alimentos de origem animal. Os ácidos graxos insaturados (com ligações duplas) podem ser monoinsaturados

(apenas uma ligação dupla), ou poliinsaturados (mais de uma ligação dupla). Os ácidos graxos são também classificados como ácidos graxos essenciais (AGE), que não são sintetizados pelo organismo (ácidos linolênico, linoléico e o araquidônico) e não essenciais que são sintetizados pelo organismo (MORGADO & GALZERANO, 2006).

Os ácidos graxos essenciais encontram-se principalmente nos óleos vegetais; sua função é diversa e não muito bem definida, participando na síntese de prostaglandinas, substância de ação hormonal, e de leucotrienos, substâncias relacionadas com células de defesa. Os ácidos linoléico e linolênico são necessários para síntese de eicosanóides (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos), além de formar parte da estrutura das membranas e encontrar-se em altas quantidades nos órgãos reprodutivos (GONZALES & SILVA, 2006).

O balanço dietético entre ácidos graxos ômega-6 e ômega-3 é um determinante da composição dos ácidos graxos das membranas, e o organismo dos animais é capaz de dessaturar e alongar os dois ácidos graxos essenciais, linoléico e α -linolênico, dando origem a duas famílias distintas de ácidos graxos poliinsaturados: ácidos graxos n-6, derivado do ácido linoléico, e ácido graxo n-3, cujo precursor é o ácido linolênico. Não existe interconversão entre essas duas famílias de ácidos graxos no organismo (GADELLA, 1996).

A adição de óleos vegetais à dieta dos eqüinos tem se tornado um procedimento comum. Os óleos são fonte de energia prontamente disponível para o consumo e, em sua maioria, são alimentos palatáveis para os eqüinos. Entretanto, os lipídeos variam em seu valor dietético devido à estrutura química dos triglicerídeos e dos ácidos graxos de cadeia longa. Há também desinformação quanto às interações que ocorrem quando eles fazem parte da dieta, o que dificulta tirar conclusões sobre o seu real valor nutritivo (MARCHELLO et al., 2000).

O óleo possui mais de 2 vezes a energia contida nos grãos, ou seja, uma ótima opção de suplementação quando o assunto é necessidade de energia e sem problemas de digestão. Existe pouca alteração na quantidade de calorias entre os óleos. Contudo, existe diferença no perfil de ácidos graxos de cada óleo e quanto a outros nutrientes interessantes que são extraídos no processo de refino. No processo de semi-refino é retirada a lecitina e a acidez, mantendo vitaminas e fitoesteróis como o gama-oryzanol, encontrado em grande concentração no óleo extraído do farelo do arroz. O gama-oryzanol é uma substância com propriedades anabolizantes que aumentam a massa muscular e antioxidantes que protegem as células durante o esforço físico. (ÁVILA,

2007). Suplementando 6 garanhões com 150mL de óleo de arroz rico em gama-oryzanol, Gobesso (2006), encontrou um aumento da concentração plasmática de testosterona durante o tratamento, e acentuada queda após o término da suplementação. Entretanto, Fry et al. (1997), suplementando homens fisiculturistas com gama-oryzanol (500mg/dia) não observaram nenhuma diferença para os níveis de hormônios circulantes (testosterona, cortisol, estradiol, hormônio do crescimento, insulina beta-endorfina), minerais, albumina ou lipídios sanguíneos.

Entre os vários nutrientes que exercem efeito sobre a biologia dos espermatozóides estão os lipídios (KELSO, 1997).

Além da função energética, os lipídeos também são componentes celulares de membranas biológicas. Em todas as espécies, os fosfolipídios são os principais componentes lipídicos dos espermatozóides, caracterizados por conterem grandes quantidades de ácidos graxos poliinsaturados – PUFAs, o que sugere que a composição de lipídios e ácidos graxos dos espermatozóides pode ser um fator determinante das taxas de fertilidade (MARTIN RILLO et al., 1996). Os PUFAs da série ômega 3 e ômega 6 são ácidos graxos essenciais, uma vez que não podem ser sintetizados pelos animais e precisam ser fornecidos pela ração. Os PUFAs são materiais oxidáveis, por possuírem duplas ligações que formam radicais livres ao se juntarem ao O₂ metabólico, dando origem aos peróxidos. Um dos antioxidantes mais utilizados na membrana é a vitamina E, que neutraliza os radicais livres, assim evita-se dano celular, o qual ocasiona desarranjos metabólicos como, por exemplo, a inibição de atividades enzimáticas (MCDOWELL, 1989).

2.4.1 O colesterol como precursor de hormônios esteroidais

O esterol mais abundante em tecidos animais é o colesterol (WANNMACHER & DIAS, 1992). O primeiro composto esteroide que se forma nas gônadas e no córtex da adrenal, a partir do colesterol é a pregnolona, composto que gera os demais esteróides. No córtex da adrenal sintetizam-se dois tipos de esteróides: os mineralocorticóides (aldosterona, o mais importante), que controlam a reabsorção de íons (Na⁺, CL⁻, HCO₃⁻) nos túbulos renais, e os glicocorticóides (cortisol, o mais importante), que regulam o metabolismo dos glicídios. Nos testículos, sintetizam-se os andrógenos (testosterona, o mais importante), que controlam os caracteres secundários e a espermatogênese (GONZALES & SILVA, 2006).

2.4.2 Prostaglandinas

Inicialmente, as prostaglandinas foram achadas no plasma seminal como secreção da próstata. Há vários tipos de prostaglandinas na natureza, entre as quais as mais importantes são as do tipo E e F (GONZALES & SILVA, 2006).

As prostaglandinas alteram as atividades das células nas quais são sintetizadas e de células vizinhas. A natureza destes efeitos pode variar de um tipo de célula a outra, em contraste com a uniformidade na ação de um hormônio tal como insulina e glucagon. O mecanismo de ação da prostaglandina PGE₁ no tecido adiposo foi estudado em detalhes. A lipólise é estimulada por hormônios tais com epinefrina, glucagon, corticotropina e hormônio estimulante da tireóide (STRYER, 1992).

2.5 Antioxidantes

O gama-oryzanol, componente do óleo de arroz, apresenta capacidade antioxidante e previne a oxidação protéica e a peroxidação lipídica quando as células são expostas aos radicais livres (PARRADO et al., 2003; SUH et al., 2005).

Estudo realizado por Xu et al. (2001) sobre os componentes do óleo de arroz, constataram que o gama-oryzanol possui uma atividade antioxidante significativamente maior que a Vitamina E. Esta atividade maior pode ser devido a sua estrutura que é muito similar a do colesterol. O gama-oryzanol pode ter uma maior habilidade de associar-se ao colesterol, tornando-se mais eficiente na proteção contra o ataque dos radicais livres.

Embora existam oito formas de ocorrência natural de Vitamina E que variam enormemente em suas atividades biológicas, o α -tocoferol constitui a forma principal e mais ativa nos alimentos e a única forma importante no corpo do equino. Para funcionar efetivamente como um antioxidante, a Vitamina E deve ser facilmente oxidada; como consequência, as formas naturalmente ocorrentes e as formas sintéticas (tocoferóis) são relativamente instáveis. Os níveis teciduais mais altos de Vitamina E conferem uma proteção antioxidante maior contra danos teciduais (LEWIS, 2000).

2.6 Radicais livres e espécies reativas de oxigênio (ROS)

As espécies reativas de oxigênio e outros radicais livres podem ser produzidos por fontes exógenas ou endógenas. As fontes exógenas de geração de ROS incluem radiação, fumo, estresse, alguns medicamentos (HALLIWELL, 1987).

Os radicais livres podem ser definidos como estruturas altamente reativas, instáveis e que possuem um elétron desemparelhado na última camada, o qual ocupa um único orbital atômico ou molecular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000). A presença de um elétron desemparelhado confere a estas espécies duas propriedades características: o paramagnetismo, uma vez que produzem facilmente um campo magnético e a alta reatividade, relacionada com o tempo de meia vida da reação, que é de microssegundos (FRIDOVICH, 1998). Como exemplo de radicais livres podemos citar o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxila (OH^{\bullet}), peroxil (RO_2^{\bullet}) e alcoxil (RO^{\bullet}) (CADENAS, 1989).

As espécies reativas de oxigênio não são necessariamente radicais livres, mas apresentam uma relação direta com a formação destes, como é o caso do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que não possuem elétrons desemparelhados (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000), mas que leva a formação do radical hidroxila (SIMON et al., 1981). Nas células os ROS são produzidos como consequência do metabolismo celular normal (DIAZ et al., 1998).

Em condições normais os ROS produzidos numa célula reagem com as defesas enzimáticas e não enzimáticas. Contudo, quando ocorre um desbalanço entre os compostos oxidantes e antioxidantes do organismo, estabelece-se uma condição denominada de estresse oxidativo, onde os radicais livres em excesso começam a produzir danos a macromoléculas biológicas como lipídios, proteínas e DNA (BECKMAN & AMES, 1996).

O ROS é um importante mediador de danos ao espermatozóide e tem sido associado com diminuição da motilidade, morfologia anormal e diminuição da capacidade de penetração espermatozóide-ovócito (AITKEN & FISHER, 1994; AITKEN, 1995).

Todas as células vivas são normalmente expostas a algumas espécies reativas de oxigênio. O estresse oxidativo demonstrou ser uma das principais causas de infertilidade masculina: uma grande proporção de homens inférteis possui níveis elevados de ROS no sêmen (AGARWAL & SAID, 2004). Devido ao seu alto teor de ácidos graxos

poliinsaturados e sua capacidade de gerar ROS, os espermatozoides humanos são muito sensíveis ao estresse oxidativo (AITKEN & CLARKSON, 1987; AITKEN et al., 1989).

Devido ao sêmen eqüino conter uma quantidade relativamente alta de ácidos graxos poliinsaturados, sua susceptibilidade aos danos oxidativos é aumentada. A peroxidação lipídica subsequente por ROS resulta em decréscimo da fluidez da membrana – um parâmetro que é essencial para o sêmen para as funções fusogênicas das reações do acrossomo e fusão do espermatozoide a membrana plasmática do oócito durante a fertilização, assim como a motilidade e resistência ao estress térmico e osmótico. Vários laboratórios têm desenvolvido métodos para detectar o grau de produção de ROS no sêmen e fluído seminal e peroxidação lipídica do sêmen, e essas provas podem se tornar clinicamente úteis como uma rotina num método de avaliação da função espermática (MEYERS, 2007).

3. Artigo

Efeito da suplementação alimentar dos garanhões com óleo de arroz contendo gama-oryzanol na qualidade espermática

Tamarini Rodrigues Arlas^a; Carolina Didonet Pederzoli^b; Paula Barros Terraciano^c;
Cristina Rodrigues Trein^a; Ivan Cunha Bustamante-Filho^{a,b,c}; Fabiana Santos Castro^a;
Rodrigo Costa Mattos^a

^aREPROLAB, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

^bDepartamento de Bioquímica, UFRGS. Porto Alegre, Brazil

^cLaboratório de Embriologia e Diferenciação Celular - HCPA

e-mail: arlas@gsurf.com.br

Os Triglicerídeos são essenciais para o metabolismo espermático e um alto nível deste está associado com boa qualidade do sêmen. O nível de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) é considerado um elemento crítico para a capacitação e está associada a motilidade espermática e com maior fluidez de membrana. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da alimentação suplementar de garanhões, com óleo de arroz comercial (Gama-Horse, HT Nutri ®, Brasil), em parâmetros espermáticos. Quatro garanhões com idades variando entre 6 e 30 anos foram utilizados. Os animais tiveram o mesmo manejo durante os 190 dias de tratamento. O experimento foi dividido em três períodos: pré-tratamento (PT) - 30 dias para a estabilização das reservas espermáticas; tratamento (TR) - 80 dias de suplementação com 200 ml de óleo arroz contendo 34% ácido linolêico, 1% ácido linolênico, 1% gama-oryzanol e 660mg/Kg vitamina E; controle (CN) - 80 dias sem suplementação de óleo de arroz. Ejaculados foram coletados duas vezes por semana com uma vagina artificial. As avaliações do sêmen foram realizadas imediatamente após a colheita, sendo avaliados volume, concentração, motilidade total, funcionalidade (HOST) e integridade (CFDA / PI) da membrana e potencial antioxidante total (TRAP). Uma amostra de sangue foi obtida cada 15 dias para avaliar testosterona e estradiol plasmáticos. Para avaliar o efeito da suplementação de óleo de arroz no sêmen os dados dos últimos 20 dias a partir da TR com os últimos 20 dias a partir da CN foram analisados com ANOVA, com uma significância estatística de 0,05. A suplementação do óleo de arroz aumentou a concentração ($P < 0,01$) (TR: $226 \times 10^6/\text{mL}$; NC: $172 \times 10^6/\text{mL}$), motilidade total ($P < 0,01$) (TR: 59%; NC: 42%), HOST ($P < 0,02$) (TR: 73%; NC: 69%) e TRAP ($P < 0,01$) (TR: 1,9 nmol Trolox / mg de proteína; CN: 0,98 nmol Trolox / mg de proteína). Não foram observadas diferenças

entre os períodos TR e CN em volume, integridade de membrana, testosterona e estradiol. A suplementação oral com o óleo de arroz comercial contendo PUFA e gama-oryzanol aumentou o potencial antioxidante total do sêmen. Além disso, foi detectada uma maior funcionalidade de membrana, provavelmente devido a defesa antioxidante evitando peroxidação lipídica da membrana espermática ou a uma melhoria da fluidez da membrana.

Palavras chave: ganhões, sêmen, antioxidantes, ácidos graxos poliinsaturados (PUFA).

Abstract

Effect of supplemental feeding of stallions with rice oil containing gamma-oryzanol in sperm quality

Tamarini Rodrigues Arlas^a; Carolina Didonet Pederzoli^b; Paula Barros Terraciano^c; Cristina Rodrigues Trein^a; Ivan Cunha Bustamante-Filho^{a,b,c}; Fabiana Santos Castro^a; Rodrigo Costa Mattos^a

^aREPROLAB, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, Brazil

^bDepartamento de Bioquímica, UFRGS. Porto Alegre, Brazil

^cLaboratório de Embriologia e Diferenciação Celular - HCPA

e-mail: arlas@gsurf.com.br

Triglycerides are essential for sperm metabolism and a high level of triglycerides is associated with good semen quality. The level of polyunsaturated fatty acids (PUFA) is considered a critical feature for capacitation and is associated with sperm motility and with increased membrane fluidity. The aim of this experiment was to evaluate the effects of the supplementary feeding of stallions, with commercial rice oil (Gama-Horse, HT Nutri[®], Brazil), on sperm parameters. Four stallions with ages ranging between 6 and 30 years were used. The animals had the same management during the 190 days of trial. The experiment was divided in three periods: pre-treatment (PT) - 30 days to sperm reserves stabilization; treatment (TR) - 80 days supplementation with 200 mL rice oil containing 34% linoleic acid, 1% linolenic acid, 1% gamma oryzanol and 660mg/Kg vitamin E; control (CN) - 80 days without rice oil supplementation. Ejaculates were collected twice a week with an artificial vagina. Semen exams were performed immediately after collection, being evaluated volume, concentration, total motility, functionality (HOST) and integrity (CFDA/PI) of membrane and total antioxidant potential (TRAP). A blood sample was obtained each 15 days to evaluate plasma testosterone and estradiol. To evaluate the effect of the rice oil supplementation the semen data from the last 20 days from TR with the last 20 days from CN were analyzed with ANOVA, with a statistical significance from 0.05. The supplementation of rice oil increased concentration ($P < 0.01$) (TR: 226×10^6 /mL; CN: 172×10^6 /mL), total motility ($P < 0.01$) (TR: 59%; CN: 42%), HOST ($P < 0.02$) (TR: 73%; CN: 69%) and TRAP ($P < 0.01$) (TR: 1.9 nmol Trolox/mg of protein; CN: 0.98 nmol Trolox/mg of protein). No differences among periods TR and CN were observed in volume, membrane integrity, testosterone and estradiol. Oral supplementation with the

commercial rice oil containing PUFA and gamma-oryzanol increased the total antioxidant potential of the semen. In addition, a higher membrane functionality and motility was detected, probably due to antioxidant protection avoiding lipid peroxidation of sperm membrane or to a improved membrane fluidity.

Key words: stallions, semen, gamma-oryzanol, polyunsaturated fatty acids (PUFA).

Introdução

As espécies reativas de oxigênio (ROS), também conhecidas como radicais livres, são íons de oxigênio diatômicos gerados através de sistemas biológicos aeróbicos ou parcialmente aeróbicos (SHARMA & AGARWAL, 1996). Estes são importantes mediadores de danos ao espermatozóide e tem sido associado com diminuição da motilidade, morfologia anormal e diminuição da capacidade de penetração espermatozóide-ovócito (AITKEN & FISHER, 1994; AITKEN, 1995).

Em diferentes espécies, suplementos alimentares com antioxidantes têm sido utilizados para melhorar a qualidade espermática (DEICHSEL et al., 2008). O óleo de arroz e seus principais componentes (ácidos graxos não saturados, fitoesteróis, tocotrienóis e α tocoferol) têm demonstrado capacidade em aumentar os lipídios plasmáticos de roedores, coelhos, primatas e humanos, reduzindo o colesterol plasmático e as concentrações de triglicerídeos. Outras propriedades potenciais do óleo de arroz e do gama-oryzanol, verificado *in vitro* e em modelos animais, incluem a modulação da secreção da hipófise, inibição da secreção gástrica, inibição da agregação plaquetária e ação antioxidante (CÍCERO e GADDI, 2001). O gama-oryzanol, componente do óleo de arroz, apresenta capacidade antioxidante e previne a oxidação protéica e a peroxidação lipídica quando as células são expostas aos radicais livres (PARRADO et al., 2003; SUH et al., 2005).

Devido ao sêmen equino conter uma quantidade relativamente alta de ácidos graxos poliinsaturados, sua susceptibilidade aos danos oxidativos é aumentada. A peroxidação lipídica causada por ROS resulta em decréscimo da fluidez da membrana – um parâmetro que é essencial para o sêmen para as funções fusogênicas das reações do acrossomo e fusão do espermatozóide à membrana plasmática do oócito durante a fertilização, assim como a motilidade e resistência ao estresse térmico e osmótico. (MEYERS, 2007).

O presente artigo teve como objetivo avaliar os efeitos da suplementação alimentar de óleo de arroz na motilidade espermática total e progressiva; morfologia espermática; concentração espermática; integridade e funcionalidade de membrana e capacidade antioxidante total do sêmen.

Material e Métodos

Local de execução

Este experimento foi realizado junto ao laboratório de Reprodução Animal (REPROLAB) que se localiza na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil (30 04' S, 51 07' W) e ao laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Departamento de Bioquímica do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS.

Animais

Foram utilizados quatro garanhões, sendo três da raça Puro Sangue de Corrida, com média de seis anos de idade e um pônei com aproximadamente 30 anos de idade.

Os animais encontravam-se no Reprolab, sob o mesmo tipo de manejo. Eram arraçoados com aveia duas vezes ao dia mais feno de alfafa. Ficavam soltos em piquetes durante todo dia com água e sal mineral à vontade e eram suplementados, por via oral, com 200mL por dia de Gama-Horse[®] (óleo de arroz contendo 34% ácido linoleico, 1% ácido linolenico, 1% gama-oryzanol e 660mg/Kg vitamina E). O tratamento teve início após um período de padronização espermática de 30 dias, chamado de PT no mês de julho de 2006. De primeiro de agosto a dezenove de outubro (80 dias) os animais foram suplementados (período chamado de TR) e de vinte de outubro a oito de janeiro de 2007 (período chamado de CN, 80 dias) não houve a suplementação. Totalizando 190 dias de experimento, conforme mostra a figura 1.

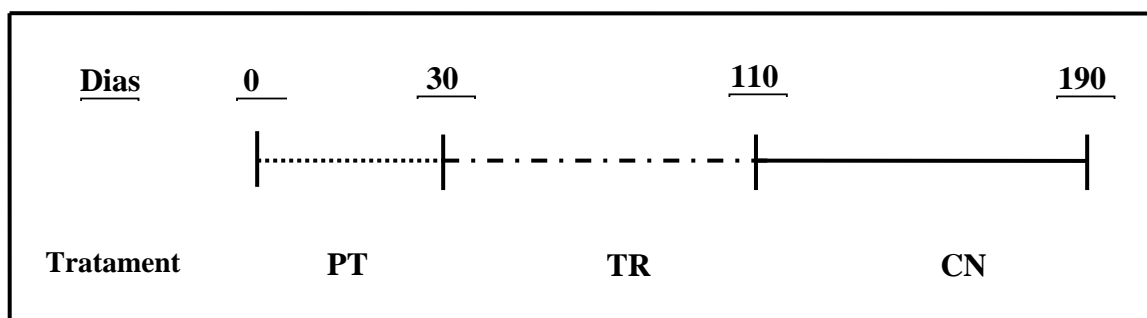


Figura 1: Esquema gráfico da suplementação dos garanhões durante as três fases do experimento: PT - Pré Tratamento; TR – Suplementação; CN - Controle

Avaliação do sêmen fresco

Foram realizadas 2 coletas de sêmen por semana por meio de vagina artificial modelo Hannover durante todo experimento.

Após a coleta, desprezou-se a fração gel e o sêmen foi filtrado com gaze estéril. Posteriormente o sêmen fresco foi avaliado quanto ao volume, concentração, motilidade (progressiva e total) e morfologia espermática. O ejaculado foi diluído em leite desnatado UHT, a 37 °C, visando obter concentração final de 25×10^6 espermatozoides/mL. Logo após a diluição, foi novamente avaliada a motilidade espermática, bem como a funcionalidade de membrana, pelo teste hiposmótico (HOST) e à integridade de membrana, pelo teste de Fluorescência, (CFDA/PI). Após a avaliação, as amostras de sêmen foram colocadas em frascos fechados e resfriadas até 5 °C. As amostras refrigeradas foram avaliadas para os mesmos parâmetros em 24 horas.

A motilidade progressiva foi avaliada por técnico experiente, avaliando porcentagem de espermatozoides que se movimentavam ativamente de forma retilínea. A motilidade total foi definida pela porcentagem de espermatozoides que apresentam movimento, podendo ser retilíneo ou em círculos.

Para a análise da integridade física da membrana, 400 µL de sêmen foram incubados com 3 µL de iodeto de propídio e 2 µL de diacetato de carboxifluoresceína, em banho-maria a 37 °C por 8 minutos. Uma alíquota foi analisada em Microscópio de Epifluorescência, em aumento de 1000 x, sob imersão. Um total de 100 células por amostra foi avaliado. Os espermatozoides que estavam totalmente corados por verde (CFDA) foram consideradas como células com membrana íntegra. Já os espermatozoides, parcialmente ou totalmente corados de vermelho (PI), foram considerados como aqueles que possuem a membrana danificada.

A integridade funcional da membrana plasmática foi avaliada através da aplicação do teste hiposmótico (HOST). Para tanto, 200 µL de água destilada foram adicionados a 100 µL de sêmen, perfazendo uma osmolaridade de 100 mOsmol/kg e logo após, as amostras foram incubadas em banho-maria a 37 °C por 8 minutos. Posteriormente, uma gota de cada amostra de sêmen foi colocada entre lâmina e lamínula para análise em Microscópio Óptico de Contraste de Fase em aumento de 400 x. Foram avaliadas 100 células de cada amostra e foram considerados com a membrana funcional os espermatozoides que aumentaram de volume, apresentando enrolamento da cauda,

conforme descrito por Lomeo e Giambersio (1991) modificado por Lagares et al. (2000).

Morfologia Espermática

Logo após a coleta, foi realizado esfregaço de sêmen em lâmina, corado pelo método de Cerowsky (1976), modificado por (MATTOS et al., 1990). As lâminas foram coradas em solução saturada de vermelho congo por 20 segundos, lavadas em água destilada e coradas em solução de violeta genciana a 0,5 % durante 5 segundos, sendo novamente lavadas e colocadas para secar. Foram avaliadas 200 células por esfregaço.

Potencial Antioxidante Total (TRAP)

A cada 15 dias, uma fração de 300 μ L de sêmen fresco de cada garanhão foi separada e adicionada a 300 μ L de uma solução tampão composto por fosfato de sódio 20 mM, cloreto de potássio 140 mM e pH 7,4. Totalizando 15 amostras por garanhão.

As amostras devidamente identificadas foram acondicionadas em um frasco tipo Eppendorf[®], mergulhadas em nitrogênio líquido por 30 segundos e armazenadas em freezer a -180 °C até a realização das análises bioquímicas.

O TRAP traduz a capacidade do tecido em resistir ao estresse oxidativo pela adição de uma fonte de radicais livres ao sistema. Mede o conteúdo de antioxidantes não-enzimáticos presentes na amostra, sendo então uma medida quantitativa (EVELSON et al., 2001).

O TRAP foi determinado através da medida da intensidade de luminescência do luminol induzida pela termólise do 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropane) (ABAP) (Lissi et al., 1992; Evelson et al., (2001) em um contador de cintilação Wallac 1409. A um vial de cintilação de vidro foram adicionados 3 mL de ABAP 10 mM (dissolvido em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4) e 10 μ L de luminol 5,6 mM, sendo medida a luminescência inicial. Após isso, 10 μ L de Trolox 160 μ M (análogo hidrossolúvel do α -tocopherol, usado como padrão) ou 30 μ L de amostra foram então adicionados ao vial, produzindo uma diminuição no valor inicial de luminescência. Esse valor é mantido baixo até que os antioxidantes presentes na amostra sejam depletados, então a luminescência retorna ao seu valor inicial. O tempo levado pela amostra para manter a luminescência baixa é diretamente proporcional à capacidade antioxidante do tecido,

então o TRAP representa a quantidade de antioxidantes não-enzimáticos presentes na amostra. Os resultados foram calculados como nmol Trolox/mg proteína (BUSTAMANTE, 2006).

A concentração de proteína foi determinada nas amostras usando albumina sérica bovina como padrão (LOWRY et al., 1951).

Coleta de sangue

Uma vez por semana era coletado sangue dos garanhões no mesmo horário, da veia jugular com agulhas descartáveis e tubos tipo Vacutainer[®] com heparina sódica como anticoagulante. Os tubos eram centrifugados a 100 g durante 10 minutos. Uma fração de plasma de cada amostra foi coletada, acondicionada em frasco de 1,5 mL tipo Eppendorf[®] e mantida em freezer a -20 °C.

As análises quantitativas do hormônio testosterona e estradiol foi realizada pelo método de radioimunoensaio.

Análise Estatística

Foi utilizada a análise de variância. Foi adotado o modelo de parcelas subdivididas, com períodos de tratamento (PT, TR e CN) nas parcelas principais, arranjos em blocos casuais (coletas). Como parcelas dependentes utilizaram-se volume, motilidade total e progressivas, integridade e funcionalidade de membrana, concentração, número total de espermatozoides, morfologia espermática, níveis plasmáticos de testosterona e de estradiol e TRAP. Como teste complementar para comparação das médias foi utilizado o teste de Tukey.

Resultados

Sêmen Fresco

Na tabela abaixo estão expressos os valores dos dados do sêmen fresco 0 hora dos quatro garanhões coletados. Foram analisados com ANOVA, os dados dos últimos 20 dias a partir da TR com os últimos 20 dias a partir da CN, com uma significância estatística de 0,05.

A suplementação do óleo de arroz aumentou a concentração ($P < 0,01$) (TR: 226 x 10⁶/mL; NC: 172 x 10⁶/mL), motilidade total ($P < 0,01$) (TR: 59%; NC: 42%), motilidade progressiva ($P = 0,03$) (TR: 69%; NC 52%), HOST ($P = 0,02$) (TR: 73%; NC: 69%) e espermatozóides morfologicamente normais ($P < 0,01$) (TR: 68%; NC: 61%). Não foram observadas diferenças entre os períodos TR e CN em volume, número total de espermatozóides e integridade de membrana.

Tabela 1: Valores das médias, desvio padrão e P do sêmen fresco durante os 20 dias finais dos períodos tratamento (TR) e controle (CN).

	TR	CN	P
Volume (mL)	42 ± 3,5	44 ± 1,9	0,54
Concentração x10 ⁶ /mL	227 ± 9,6	172 ± 5,7	0,00
NTE x10 ⁹	9 ± 0,7	8 ± 0,6	0,24
Motilidade Total %	59 ± 2,7	42 ± 1,4	0,00
Motilidade Progressiva %	69 ± 0,8	52 ± 0,4	0,03
Membrana Plasmática Funcional (HOST) %	73 ± 0,8	69 ± 1,5	0,02
Membrana Plasmática Íntegra (CFDA/PI) %	81 ± 1,1	78 ± 1,6	0,13
Morfologia Espermática Normal %	68 ± 4,9	61 ± 2,7	0,00
Morfologia Defeitos Primários %	11 ± 7,2	9 ± 4,9	0,27

(NTE – número total de espermatozóides)

Sêmen 24 horas

Observa-se que a suplementação com óleo de arroz melhorou ($P < 0,01$) a motilidade total durante o tratamento. Entretanto, não se observaram diferenças ($P > 0,05$) na motilidade progressiva e na funcionalidade e integridade de membrana plasmática entre o período de tratamento e o período de controle. (Tabela 2).

Tabela 2: Valores das médias, desvio padrão e P do sêmen preservado por 24 horas a + 5°C nos 20 dias finais dos períodos tratamento (TR) e controle (CN).

	TR	NC	P
Motilidade Total %	34 ± 9,1	22 ± 5,9	0,00
Motilidade Progressiva %	5 ± 1,3	4 ± 1,2	0,21
Membrana Plasmática Funcional (HOST) %	50 ± 13,6	58 ± 9,9	0,14
Membrana Plasmática Íntegra (CFDA/PI) %	71 ± 6,8	68 ± 3,2	0,22

Testosterona

Os valores médios de testosterona circulante nos quatro ganhões durante os 20 dias finais do período TR e do período CN estão expressos na Figura 2. Não se verificaram diferenças significativas ($P = 0,4$) entre os dois períodos.

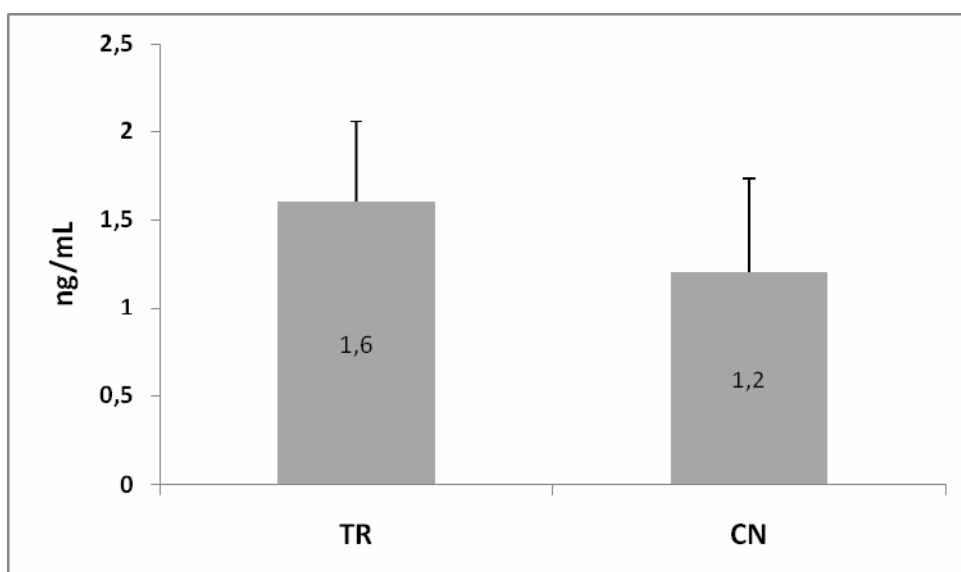


Figura 2 Valores médios de testosterona circulante nos quatro ganhões durante os 20 dias finais do período TR (tratamento) e do período CN (Controle)

Potencial antioxidante total (TRAP)

Os valores médios do Potencial Antioxidante total do sêmen dos quatro garanhões durante todo o experimento encontram-se expressos na Figura 3. Observa-se que ocorreu um aumento gradativo do TRAP durante a suplementação (TR) - amostras 4 a 9- em relação ao período PT - amostras 1 a 3- com posterior diminuição dos valores durante o período CN - amostras 10 a 15- ($P = 0,01$).

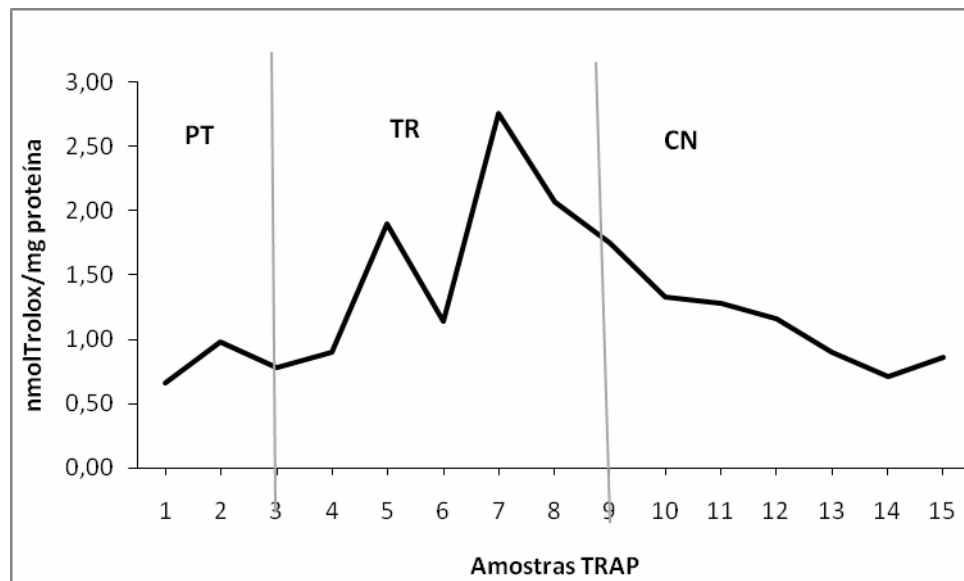


Figura 3: Valores médios de TRAP dos garanhões nos períodos pré-tratamento (PT) amostras 1 a 3, tratamento (TR) amostras 4 a 9 e Controle (CN) amostras 10 a 15. ($P = 0,01$).

O valor médio de TRAP do sêmen dos reprodutores durante o período PT foi de 0,87 nmolTrolox/mg proteína, aumentando significativamente ($P = 0,01$) durante os últimos 20 dias de suplementação (1,91 nmolTrolox/mg proteína) e retornando a valores semelhantes do período PT durante os 20 dias finais do período CN (0,78 nmolTrolox/mg proteína) (Figura 4).

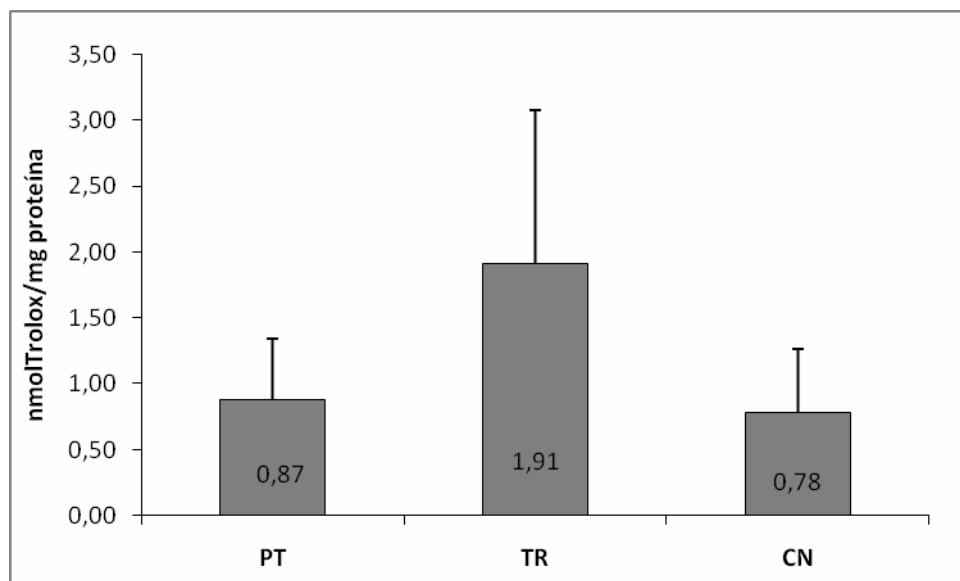


Figura 4: Valores médios de TRAP do sêmen dos ganhões durante o período PT e nos últimos 20 dias dos períodos TR e CN.

Discussão

Os resultados do presente estudo demonstram que após suplementação com óleo de arroz contendo antioxidantes (gama-oryzanol e vitamina E), ácidos graxos poliinsaturados (ácidos linolênico e linoléico) e com possíveis efeitos anabolizantes causados pelo γ -oryzanol observou-se uma melhora na capacidade antioxidante do sêmen, em uma melhora na morfologia espermática, num aumento da motilidade espermática, um aumento da concentração espermática e uma melhora na funcionalidade de membrana.

O efeito antioxidante da suplementação foi comprovado com a melhora na capacidade antioxidante total do sêmen no presente experimento. Entretanto, os efeitos antioxidantes podem também ter influenciado a motilidade espermática, a concentração, a morfologia e a funcionalidade de membrana.

Observando o efeito da suplementação por 60 dias com óleo de arroz rico em gama oryzanol na qualidade espermática de ganhões, Gobesso (2006) observou uma tendência dos ganhões a apresentarem maior volume seminal, menor quantidade de espermatozoides com defeitos maiores e durante todo período experimental, melhores índices de motilidade espermática. Suplementando 15 ganhões durante 14 semanas com Vitamina E como fonte de antioxidante acrescido de óleo de soja, Gee et al. (2008) obtiveram uma melhora na motilidade espermática. Utilizando suplemento comercial,

durante 8 semanas, contendo antioxidantes (vitamina E -tocoferol, ácido ascórbico e ácido fólico) e L-Carnitina, como fonte de antioxidantes em pôneis Shetland, Deichsel *et al.* (2008) observaram uma diminuição na porcentagem de defeitos espermáticos durante o tratamento, entretanto não verificaram melhora na qualidade do sêmen e na contagem total de espermatozóides. Este resultado pode estar relacionado à natureza do antioxidante utilizado, pois o gama-oryzanol, além de ser fonte de tocoferol (Vitamina E) é também fonte de tocotrienol, antioxidante, com maior conteúdo de vitamina que o do tocoferol (SUGANO & TSUJI, 1995). A maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular, com exceção da vitamina E (tocoferol) (HEBBEL, 1986).

Da mesma forma, suplementando com vitaminas C e E diferentes espécies tais como humanos (ESKENAZI *et al.*, 2005), ratos (SÖNMEZ *et al.*, 2005) e javalis (STRZEZEK *et al.*, 2004; AUDET *et al.*, 2004) observaram incremento na qualidade do sêmen. A suplementação da dieta humana com diferentes antioxidantes melhora a qualidade seminal (ESKENAZI *et al.*, 2005). A suplementação com vitamina C aumentou o número total de espermatozóides, a motilidade total e progressiva e a concentração espermática. Utilizando Vitamina E observou-se aumento da motilidade total e progressiva e suplementando a dieta com β -caroteno aumentou a concentração espermática e a motilidade total. Strzezek *et al.* (2004), adicionando Vitamina E, Vitamina C e Selênio à dieta de javalis, observou diferença significativa na concentração espermática e no número total de espermatozóides. Da mesma forma, a suplementação com Vitamina E em cães incrementou a motilidade espermática, vigor e concentração, além de um decréscimo na contagem de defeitos maiores nos espermatozóides (HATAMOTO *et al.*, 2006).

Os níveis de antioxidantes no sêmen apresentam uma relação direta com a motilidade espermática (LEWIS *et al.*, 1995). Utilizando sêmen humano Smith *et al.* (1996) observaram um aumento nos níveis de antioxidantes não enzimáticos superiores nos homens férteis em relação aos homens inférteis.

A melhora observada na funcionalidade de membrana (Teste Hiposmótico), durante a suplementação no presente experimento, pode ser atribuída a sua suscetibilidade à ação das espécies reativas de oxigênio. A membrana é um dos componentes celulares mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, acarretando alterações na sua estrutura e em sua permeabilidade (MELO FILHO *et al.*, 1983). É sabido que os antioxidantes interferem na função espermática normal via peroxidação de ácidos graxos não saturados na membrana plasmática dos espermatozóides que resulta em uma

queda na qualidade espermática (AITKEN & CLARKSON, 1987). Ainda que a geração controlada de ROS tenha funções fisiológicas em diferentes tipos de células, altas concentrações são deletérias às funções celulares, podendo danificar todos os tipos de biomoléculas, incluindo DNA, proteínas e lipídios. Para proteger-se do efeito deletério dos ROS, a célula possui um sistema de defesa antioxidante. Distúrbios no balanço oxidante – antioxidante, em favor do oxidante, levam ao estresse oxidativo, que pode ser causado por redução na quantidade de antioxidantes nos sistemas de defesa celular ou por aumento na produção de ROS (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2000). A geração de altas concentrações de ROS no sêmen está associada ao declínio no metabolismo de energia do espermatozóide, na motilidade e na viabilidade espermática e com a fragmentação do DNA em eqüinos, bovinos e humanos (BAUMBER et al., 2002; BILODEAU et al., 2002; ARMSTRONG et al., 1999).

O sêmen de todos os animais domésticos contém elevados níveis de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), em particular, ácido docohexanóico e ácido docosapentanóico (ômega 6). O sêmen de garanhões tem altos níveis de ácido docosapentanóico (PARKS & LYNCH, 1992). Uma vez que os animais são incapazes de sintetizar PUFAs, devem adquiri-los a partir de precursores na dieta. Os PUFAs têm mostrado efeitos positivos na capacidade espermática em várias espécies (BLESBOIS et al., 1997).

A melhora da motilidade espermática, da concentração, da funcionalidade de membrana e da morfologia espermática observadas durante o presente experimento pode também ter sido ocasionada pela adição de ácidos graxos na dieta devido a um aumento da fluidez de membrana. Brinsko et al. (2005), realizaram um experimento com 8 garanhões durante 14 semanas com a suplementação na dieta de nutracêutico, rico em ácido graxo docosahexaenoico (omega 3). Após 24 horas o sêmen foi resfriado e armazenado em Equitainer[®] e não foi observada melhora nos resultados de motilidade progressiva e total, contudo 48 horas após este resfriamento o sêmen obteve melhora significativa na motilidade total e progressiva. Elhordoy et al., (2008) suplementaram eqüinos durante 80 dias com PUFA em particular ácido docosahexaenoico e obtiveram uma melhora significativa nos parâmetros: motilidade, concentração e morfologia espermática.

O gama-orizanol é uma substância com propriedades anabolizantes que aumentam a massa muscular e antioxidantes que protegem as células durante o esforço físico. (ÁVILA, 2007). Em humanos o consumo de gama-oryzanol pode ocorrer pela crença de

que este venha gerar efeitos que variam no aumento na produção e liberação de testosterona e á estimulação do Hormônio do Crescimento (CICERO & GADDI, 2001).

No presente experimento não foram observados aumento nas concentrações plasmáticas de testosterona, demonstrando que o gama-oryzanol não apresentou efeitos anabolizantes. Este resultado está de acordo com os encontrados em outras espécies como: humanos (FRY et al., 1997), cães (HATAMOTO et al., 2006), suínos (AUDET et al., 2004) e coelhos (ANDREAZZI et al., 2002). Em homens fisiculturistas suplementados com gama-oryzanol por via oral durante 9 semanas não foi observada diferença significativa para os níveis de hormônios circulantes (testosterona, cortisol, estradiol, GH, insulina, beta-endorfina), minerais (cálcio e magnésio), albumina ou lipídios sanguíneos (FRY et al., 1997). Contudo, Gobesso (2006) observou um aumento das concentrações plasmáticas de testosterona, e uma acentuada queda após o termino da suplementação com gama-oryzanol em eqüinos.

Conclui-se que a suplementação com óleo de arroz, contendo ácidos graxos e gama-oryzanol melhora o potencial antioxidante total do sêmen. Além disso, observou-se uma melhora na motilidade espermática e na funcionalidade de membrana provavelmente devido a uma proteção antioxidante evitando a peroxidação lipídica da membrana espermática ou a um aumento da fluidez de membrana. Não se observou efeito anabolizante com a suplementação de gama-oryzanol.

4 CONCLUSÃO

Conclui-se que a suplementação com óleo de arroz, contendo ácidos graxos e gama-oryzanol melhora o potencial antioxidante total do sêmen. Além disso, observou-se uma melhora na motilidade espermática e na funcionalidade de membrana provavelmente devido a uma proteção antioxidante evitando a peroxidação lipídica da membrana espermática ou a um aumento da fluidez de membrana.

A suplementação de gama-oryzanol não tem efeito anabolizante no ganhão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AITKEN, R. J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 7, p. 559-668, 1995.

AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v. 81, n. 4, p. 459-469, 1987.

AITKEN, R. J.; FISHER, H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. **Bioassays**, v. 16, p. 259-267, 1994.

AITKEN, R. J.; IRVINE, D. M.; WU, F. C. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, v. 164, p. 542-551, 1989.

AGARWAL, A.; SALEH, R. A.; BEDAIWY, M. A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertil. Steril.**, Los Angeles, v. 79, p. 829-843, 2003.

AGARWAL, A.; NALLELLA, K. P.; ALLAMANENI, S. S. R.; SAID, T. M. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. **Repro. Biomed. Online**, v. 8, p. 616-627, 2004.

AGARWAL, A.; SAID, T. M. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. **BJU Internat.**, v. 95, p. 503-507, 2004.

AMANN, R. P. Computerized evaluation of stallion spermatozoa. **Proc. Ann. Conv. Am. Assoc. Equine Pract.**, v. 33, p. 453-473, 1987.

ANDREAZZI, M. A.; REDIVO, A. G. S.; HERNANDES, F. C.; JUNIOR, G. M. A. Avaliação dos níveis séricos de testosterona em coelhos NZB alimentados com dietas contendo diferentes fonte de óleo vegetal. **Cesumar**, v. 4, n. 2, p. 143-148, 2002.

ARMSTRONG, J.S.; RAJASEKARAN, M.; CHAMULITRAT, W.; GATTI, P.; HELLSTROM, W.J.; SIKKA, S.C. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. **Free Radical Biology & Medicine**, v.26, n.7/8, p. 869-880, 1999.

AUDET, I.; LAFOREST, J. P.; MARTINEAU, G. P.; MATTE, J. J. Effect of vitamin supplements on some aspects of performance, vitamin status, and semen quality in boars. **J. Anim. Sci.**, v. 82, p. 626-633, 2004.

ÁVILA, R. I. Óleo na dieta dos cavalos. **Técnicas & Veterinária**, 2007. Disponível em:<<http://www.endurancebrasil.com.br>>. Acesso em: 9 fev. 2007.

BALL, B. A.; VO, A. T. Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon lipophilic fluorescent de C11-BODIPY581/591. **J. Androl.**, Philadelphia, v. 23, p. 259-269, 2002.

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

BEDFORD, S.J.; JASKO, D.J.; GRAHAM, J.K.; AMANN, R.P.; SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W. Effect of seminal extenders containing egg yolk and glycerol on motion characteristics and fertility of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 43, p. 955-967, 1995.

BIELANSKI, W. The evaluation of stallion semen in aspects of fertility control and its use for artificial insemination. **J. Reprod. Fertil.**, v. 23, p. 19-24, 1975.

BIELANSKI, W.; KACZMARSKI, F. Morphology of spermatozoa in semen from stallion of normal fertility. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 27, p. 39-45, 1979.

BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; CORMIER, N.; SIRAD, M. A. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. **Theriogenology**, v.57, p.1105-1122, 2002.

BLACH, E.L.; AMANN, R.P.; BOWEN, R.A.; FRANTZ, D. Changes in quality of stallion spermatozoa during cryopreservation: plasma membrane integrity and motion characteristics. **Theriogenology**, v. 31, p. 283–298, 1989.

BALTES, T. J. **Plasma membrane evaluation with fluorescent stains, and computer-measured motility as indicators of in vitro aging of boar spermatozoa.** Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Escola Superior de Veterinária de Hannover, Alemanha, p.102, 1993.

BECKMAN, K. B.; AMES, B.N. Detection and quantification of oxidative adducts of mitochondrial DNA. **Methods Enzymol.** v. 53, p. 264-442, 1996.

BLESBOIS, E.; LESSIRE, M.; GRASSEAU, I.; HALLOUS, J. M.; HERMIER, D. Effect of dietary fat on the fatty acid composition and fertilizing ability of fowl semen. **Biol. Reprod.**, v. 56, p. 1216-1220, 1997.

BLOM, E. Über Spermauntersuchungenmethoden beim Bullen. *Wienerische Tierärztliche Monatschrift* 36, p.49-168, 1949.

BLOM, E. Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of bull spermogram. **Nord Vet. Med.**, v. 25, n. 7-8, p. 383, 1972.

BRINSKO, S.P.; VARNER, D.D. Artificial insemination and preservation of semen. In: BLANCHARD, T.L.; VARNER, D.D. Stallion management. **Vet. Clin. North America: Eq. Pract.**, v. 8, n. 1, p. 205-218, 1992.

BRINSKO, S. P.; VARNER, D. D.; LOVE, C. C.; BLANCHARD, T. L.; DAY, B. C.; WILSON, M. E. Effect of feeding a DHA-enriched nutraceutical on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen. **Theriogenology**, v. 63, p. 1519–1527, 2005.

BROWN, C. M.; BERTONE, J. J. **Consulta Veterinária em 5 minutos: Espécie Equina**. 1 ed. São Paulo: Manoele, 2002, p. 134-137.

BUSTAMENTE-FILHO, I. C. **Estresse oxidativo na criopreservação do sêmen eqüino**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia-Produção Animal). Faculdade de Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, 2006

CADENAS, E. Biochemistry of oxygen toxicoty. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 58, p. 79-110, 1989.

CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmáticas, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. 2005. 186 f. Tese de doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Pirassununga, 2005.

CEROWSKI, J. Metoda barveni kancich spermu pro morlogizínhe harmocem. **Ziv.Vy.**, v. 21, p. 361, 1976.

CÍCERO, A. F., GADDI, A. Rice bran oil and gamma-oryzanol in the treatment of hyperlipoproteinaemias and other conditions. **Phytother Res.**, v. 15, p. 277-289, 2001.

DE LAMIRANTE, E.; GAGNON, C. Impact of reative oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. **Hum. Reprod.**, v. 10, p. 15-21, 1995.

DEICHSEL, K., PALM, F., KOBLISCHKE, P., BUDIK, S., AURICH, C. Effect of a dietary antioxidant supplementation on semen quality in pony stallions. **Theriogenology**, v. 69, n. 8, p. 940-945, 2008.

DIAZ, J.; SERRANO, E.; ACOSTA, F.; CARBONELL.; L. F. References intervals for four biochemistry analittes in plasma for evaluating oxidative stress and lipid peroxidation in human plasma. **Clin. Chem.**, v. 44, n. 10, p. 2215-2217, 1998.

DREVIUS, L. O.; ERIKSSON, H. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. **Experimental Cell Research**, v. 42, p. 136-156, 1966.

DOTT, D.M. Morphology of stallion spermatozoa. **J. Reprod. Fertil.**, v. 23, p. 41-46, 1975.

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.

EINARSSON, S. Concluding Remarks. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 88, p. 165-166, 1992.

ELHORDOY, D. M.; CAZALES, G.; COSTA.; ESTÉVEZ, J. Effect of dietary supplementation with DHA on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen. **Dpto. Reprod. Anim. Facul. de Vet.**, Montevideo, 2008.

ESKENAZI, B.; KIDD, S. A.; MARKS, A. R.; SLOTER, E.; BLOCK, G.; WYROBEK, A. J. Antioxidant intake is associated with semen quality in healthy man. **Hum. Reproduction**, v.20, p. 1006-1012, 2005.

EVELSON, P.; TRAVACIO, M.; REPETTO, M.; ESCOBAR, J.; LLESUY, S. F.; LISSI, E. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 388, p. 261-266, 2001.

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

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **J. Exp. Biol.**, v. 201, p. 1203-1209, 1998.

FRY, A. C.; BONNER, E.; LEWIS, D. L.; JOHNSON, R. L.; STONE, M. H.; KRAEMER, W.J. The effects of gamma-oryzanol supplementation during resistance exercise training. **International Journal of Sport Nutrition**, n.7, p. 318-329, 1997.

GADELLA, B. M. Lipid changes in the plasma membrane of capacitating boar spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, Neutadt, v. 31, n. 1, p. 63-73, June 1996.

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

GARNER, D. L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biology of Reproduction**, v. 34, p. 127-138, 1986.

GEE, E. K.; BRUEMMER, P. D.; SICILIANO, P. M.; McCUE.; SQUIRES, E. L. Effects of dietary vitamin E supplementation on spermatozoal quality in stallions with suboptimal post-thaw motility. **Equine Reprod. Lab.**, Colorado State University, 2008.

GRIVEAU, J. F.; LE LANNOU, D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. **Int. J. Androl.**, Copenhagen, v. 20, p. 61-69, 1997.

GOBESSO, A. A. O. **Efeito da suplementação com óleo de arroz semi-refinado rico em gama-oryzanol sobre o escore corporal, ganho de peso, digestibilidade da dieta, qualidade espermática, nível plasmático de testosterona de garanhões.** Pirassununga, Universidade de São Paulo, 2006.

GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. **Introdução á bioquímica clínica veterinária.** 2 ed. Porto Alegre: UFRGS, 2006, p. 121-139.

HAFEZ, E. S. E. Equinos. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 6 ed. São Paulo: Manole, 1995.

HAFEZ, E. S. E. Equinos. In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7 ed. São Paulo: Manole, 2007, p. 193-218.

HALLIWELL, B. Oxigens radicals and metal ions: Potencial antioxidant intervention strategies. **Ann Interme. Med.**, v. 107, p. 526-545, 1987.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3ed. New York: Oxford University Press Inc., 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3ed. Clarendon, Oxford University Press Inc., 2000.

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. **Jornal of Andrology**, v. 11, n. 1, p. 73-88, 1990.

HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p. 343-352, 1990.

HAUGLAND, R.P. Handbook of fluorescent probs and research chemicals. **Molecular Probs.**, inc. Eugene, p.81- 234, 1992.

HATAMOTO, L. K.; SOBRINHO, C. A. B.; NICHI, M.; BERNABE, V. H.; BERNABE, R. C.; CORTADA, C. N. M. Effects of dexamethasone treatment (to mimic stress) and Vitamin E oral supplementation on the spermiogram and on seminal plasma spontaneous lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in dogs. **Theriogenology**, v. 66, p.1610–1614, 2006.

HEBBEL, R. P. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 107, p. 401-401, 1986.

JASKO, D. J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. In: CONGRESSO DE MEDICINA EQUINA, 1, Jaboticabal, SP, 1994. **Proceedings**. Jaboticabal, 1994, p. 156-165.

JASKO, D.J., LITTLE, T.V., SMITH, K., LEIN, D.H., FOOTE, R.H. Objective analysis of stallion sperm motility. **Theriogenology**, v. 30, p. 1159–1167, 1988

JASKO, D. J.; LITTLE, T. V.; LEIN, D. H.; FOOTE, R. H. Comparison of espermatozoal movement and semen characteristics with fertility in stallions: 64 cases (1987-1988). **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, Schaumburg Illinois, v. 200, n. 7, p. 979-985, 1992.

JEYANDRAN, R. S.; VAN DER VEN, H. H.; PEREZPELAEZ, M. Development of na assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its

relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 70, n. 2, p. 219-228, May 1984.

JONES, R.; MANN, T.; SHERINS, R. J. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa: spermicidal fatty acids peroxides and protective action of seminal plasma. **Fertil. Steril.**, v. 31, p. 531-537, 1979.

JOHNSON, L. A., MAXUEL, W. M. C., BRISKY, J. R. Staining sperm or viability assessment. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 31, n. 1, p. 37-45, 1996.

KELLER, A. **Efeito de dois Métodos de Remoção do Plasma Seminal, de três Diluentes e do Tempo de Armazenamento sobre algumas Características Espermáticas dos Equinos**. 1998. Dissertação. Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, 1998.

KELSO, K. A. CEROLINI, S.; SPEAKE, B. K.; CAVALCHINI, L. G.; NOBLE, R. C. Effect of dietary supplementation with α Linolenic acid on the phospholipids fatty acid composition and quality of spermatozoa in cockerel from 24 to 72 week of age. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 110, p. 53-59, 1997.

KENNEY, R. M.; HURTGEN, J.; PIERSON, R.; WHITERSPOON, D.; SIMONS, J. **Manual for clinical fertility evaluation of the stallion**. Hastings-E.U.A., Society for Theriogenology, 1983.

KOHNE, K.; PETZOLDT, R.; SIEME, H.; TÖPFER-PETERSEN, E.; KLUG, E. Osmotische Resistenz von Hengstspermien und deren Beziehungen zur Flüssig- und Tiefgefrierkonservierungsfähigkeit. **Reprod. Dom. Anim.**, v.3, p.128, 1995.

LAGARES, M.A.; **Bestimmung der osmotischen Resistenz von Hengsamenzellen**. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária, Tierärztliche Hochschule, Hannover, Deutschland), 1995.

LAGARES, M. A.; MEIRELLES, L. S.; WALD, V. B.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Efeito de diferentes diluentes sobre a membrana plasmática do espermatozóide equino e fertilidade do sêmen resfriado. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 7, n. 3, p. 153-156, 2000.

LECHNIAK, D.; KEDZIERSKI, A.; STANISLAWSKI, D. The Use of HOS Test to Evaluate Membrane Functionality of Boar Sperm Capacitated in vitro. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 37, p. 379-380, 2002.

LEWIS, L. D. **Nutrição Clínica Equina: Alimentação e Cuidados**. 1 ed. São Paulo: Roca, 2000., p. 49-51.

LEWIS, S. E.; BOYLE, P. M.; MCKINNEY, K. A. Total antioxidant capacity of seminal plasma in fertile and infertile men. **Feml. Steril.**, v. 64, p. 868-870, 1995.

LISSI, E.; PASCUAL, C.; DEL CASTILLO, M. D. Luminol luminescence induced by 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropane) thermolysis. **Free Rad. Res. Comm.**, v. 17, p. 299-311, 1992.

LOMEO, A. M.; GIAMBERSIO, A. M. Water test: A simple method to assess sperm-membrane integrity. **Int. J. Andr.**, v.14, p. 278-282, 1991.

LOWEY, O. H.; ROSEBROUGH, W. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p. 264-275, 1951.

MARCHELLO, E.V.; SCHURG, W.A.; MARCHELLO, J.A. et al. Changes in lipoprotein composition in horses fed a fat-supplemented diet. **J. Equine Vet. Sci.**, v. 20, p. 453-458, 2000.

MCDOWELL, L. R. **Vitamin in animal nutrition**: comparative aspect to human nutrition. Washington: Academic, 1989, p. 486.

MARTIN RILLO, S. et al. Bora semen evaluation in practice. **Reproduction Domestic Animal**, v. 31, n. 4, p. 519-526, 1996.

MATTOS, R. **Influência de diferentes métodos de preservação de sêmen equino sobre a fertilidade, motilidade espermática e contaminação bacteriana**. 1995.

MATTOS, R. C.; CAVALHEIRO, E.; MIES FILHO, A.; GREGORY, R. M. Cerovsky – Método alternativo para avaliação morfológica de espermatozoides de equinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.14, n. 4, p. 243-247, 1990.

MELLO-FILHO, A. C.; HOFFMAN, M. E.; MENEGHINI, R. Cell killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochem. J.** v. 218, p. 273-275, 1983.

MEYERS, S. A., Advanced Semen Tests for Stallions. In: SAMPER, R. C.; PYCOCK, J. F.; MCKINNON, A. O. **Current Therapy in Equine Reproduction**. 5 ed, Saunders, 2007, p. 275-280.

MEYERS, S. A., Sperm Physiology. In: SAMPER, J. C. **Equine Breeding Management and Artificial Insemination**. Saunders, 2000, p. 27-39.

MORGADO, E.; GALZERANO, L. Utilização de óleos em dietas para equinos. **Revista Eletrônica Veterinária**, v. 7, n. 10, 2006. Disponível em: <<http://www.veterinaria.org>>. Acesso em: 18 jul. 2008.

MORTIMER, S. T.; SCHEVAERT, D.; SWAN, M. A.; MORTIMER, D. Quantitative observations of flagellar motility of capacitating human spermatozoa. **Human reproduction**, v. 12, p. 1006-1012, 1997.

NIKOLOPOULOU, M.; SOUCEK, D. A.; VARY, J. C. Changes in the lipid content of boar sperm plasma membranes during epididymal maturation. **Biochimica et Biophysica Acta**, Philadelphia, v. 815, n. 3, p. 486-498, June 1985.

PACE, M. M; SULLIVAN, J. J. Effect of timing insemination, numbers of spermatozoa and extender components on the pregnancy rate in mares inseminated with frozen stallion sêmen. **Journal of Reproduction and Fertility. Supl.** v. 23, p. 115-121, 1975.

PARRADO, J.; MIRAMONTES, E.; JOVER, M.; MÁRQUEZ, J. C.; ANGELES MEGIAS, M.; COLLANTES de TERAN, L.; ABSI, E.; BAUTISTA, J. Prevention of brain protein and lipid oxidation elicited by a water-soluble oryzanol enzymatic extract derived from rice bran. **Eur. J. Nutr.**, v. 42, p. 307-314, 2003.

PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 39, p. 209-222, 1992.

PARKS, J. E.; LYNCH, D. V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, v. 29, p. 255-266, 1992.

PASQUALOTTO, F. F.; SHARMA, R. K.; NELSON, D. R. Relationship between oxidative stress, semen characteristics and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigations. **Fertil. Steril.**, Los Angeles, v. 73, p. 459-464, 2000.

PICKET, B. W.; VOSS, J. L. Reproductive management of the stallion. **Proceedings Eighteenth Annual Convection**, p. 501-531, 1972.

PICKETT, B. W. Seminal extenders and cooled semen. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. Filadélfia: Léa & Febiger, 1993, p. 746-754.

RIVLIN, J.; MENDEL, J.; RUBINSTEIN, S., ETKOVITZ, N.; BREITBART, H. Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. **Biol. Reprod.** V. 70, p. 518-522, 2004.

SHARMA, R. K.; AGARWAL, A. Role of reactive oxygen species in male infertility. **Urology**, v. 48, p. 838-850, 1996.

SHARMA, R. K.; PASQUALOTO, F. F.; NELSON, D. R. The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. **Hum. Reprod.**, v.14, p. 2801-2807, 1999.

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

SIMON, R. H.; SCOGGIN, C. H.; PATERSON, D. Hydrogen peroxide causes the fatal injury in human fibroblasts exposed to oxygen radicals. **J. Biol. Chem.**, v. 256, n. 14, p. 7181-7186, 1981.

SMITH, R.; VANTMAN, D.; PONCE, J.; ESCOBAR, J.; LISSI, E. Total antioxidant capacity of human seminal plasma. **Human Reproduction**, v. 11, n. 8, p. 1655-1660, 1996.

SÖNMEZ, M.; TÜRK, G.; YÜCE, A. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of Wistar rats. **Theriogenology**, v. 63, p. 2063-2072, 2005.

STREYER, L. **Bioquímica**: Metabolismo de Ácidos Graxos. 3 ed. Guanabara Koogan, cap. 20, 1992, p. 387-407.

STRZEZEK, J.; FRASER, L.; KUKLINSKA, M.; DZIEKONSKA, A.; LECEWICZ, M. Effects of dietary supplementation with polyunsaturated fatty acids and antioxidants on biochemical characteristics of boar semen. **Reprod. Biol.**, v. 4, p. 271-287, 2004.

SUGANO, M.; TSUJI, E. **Rice bran oil and cholesterol metabolism**. In: VII Asian Conference of Nutrition – Lipid Symposium Proceedings. Beijing, China – 1995.

SUH, M. H.; YOO, S. H.; CHANGS, P. S.; LEE, H. G. Antioxidative activity of microencapsulated gamma-oryzanol on high cholesterol-fed rats. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 9747-9750, 2005.

VARNER, D.D.; BLANCHARD, T.L.; MEYERS, P.J.; MEYERS, S.A. Fertilizing capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 20°C. **Theriogenology**, v. 32, n. 4, p. 515-525, 1989.

VESTERGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONKLIN, K. Computer Assisted Semen Analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149-179, 2002.

WANG, X.; SHARMA, R. K.; SIKKA, S. C. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. **Fertil. Steril.**, v. 80, p. 531-535, 2003.

WANNMACHER, C. M. D.; DIAS, R. D. **Bioquímica Fundamental**: Metabolismo de Lipídeos. 6 ed. Departamento de Bioquímica UFRGS, 1992, p. 276-289.

WOLFE, C. C.; JAMES, P. S.; MACKIE, A.R.; LADHA, S.; JONES, R. Regionalized lipid diffusion in the plasma membrane of mammalian spermatozoa. **Biol. Reprod.**, v. 59, p. 1506-1514, 1998.

XU, Z.; NA HUA.; GODBER, J. S. Antioxidant activity tocopherols, tocotrienols, and gamma-oryzanol components from rice bran against cholesterol oxidation accelerated by 2,2'-Azobis (2-methylpropionamide) Dihydrochloride. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, p. 2077-2081, 2001.

YÁNIZ, J. L.; SANTOLARIA, P.; MARCO-AGUADO, M^a A.; LOPEZ-GATIUS, F. Use of image analysis to assess the plasma membrane integrity of ram spermatozoa in different diluents. **Theriogenology**, n. 70, p. 192-198, 2008.