



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**QUALIDADE DO SÊMEN FRESCO, REFRIGERADO E CRIOPRESERVADO EM  
GARANHÕES SUPLEMENTADOS COM PRODUTO COMERCIAL COMPOSTO  
POR AMINOÁCIDOS, VITAMINAS, ANTIOXIDANTES E MINERAIS.**

**MARIANE LEÃO FREITAS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**BRASÍLIA/DF  
SETEMBRO DE 2015**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**QUALIDADE DO SÊMEN FRESCO, REFRIGERADO E CRIOPRESERVADO EM  
GARANHÕES SUPLEMENTADOS COM PRODUTO COMERCIAL COMPOSTO  
POR AMINOÁCIDOS, VITAMINAS, ANTIOXIDANTES E MINERAIS.**

**ALUNA: MARIANE LEÃO FREITAS**

**ORIENTADOR: RODRIGO ARRUDA DE OLIVEIRA**

**CO-ORIENTADOR: IVO PIVATO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**PUBLICAÇÃO: 140/2015**

**BRASÍLIA/DF  
SETEMBRO DE 2015**

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

FREITAS, M. L. **Qualidade do sêmen fresco, refrigerado e criopreservado em garanhões suplementados com produto comercial composto por aminoácidos, vitaminas, antioxidantes e minerais.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2015, 47p., Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e seu orientador reservam para si os outros direitos autorais de publicação. Nenhuma parte dessa dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

### FICHA CATALOGRÁFICA

FREITAS, M. L. **Qualidade do sêmen fresco, refrigerado e criopreservado em garanhões suplementados com produto comercial composto por aminoácidos, vitaminas, antioxidantes e minerais.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2015, 47p., Dissertação (Mestrado em Ciências Animais). Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2015.

1. Espermatogênese 2. Fertilidade 3. Inseminação Artificial  
4. Nutrição 5. Sêmen

CDD ou CDU  
Agris/ FAO

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**SUPLEMENTAÇÃO DE GARANHÕES COM NUTRACÊUTICO,  
VISANDO INCREMENTO NA QUALIDADE DO SÊMEN FRESCO,  
REFRIGERADO E CRIOPRESERVADO.**

**MARIANE LEÃO FREITAS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAIS,  
COMO PARTE DOS REQUISITOS  
NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU  
DE MESTRE EM CIÊNCIAS ANIMAIS.**

**APROVADA POR:**

---

**RODRIGO ARRUDA DE OLIVEIRA, Prof. Dr. (Universidade de Brasília)  
(ORIENTADOR)**

---

**ALEXANDRE FLORIANI RAMOS, Dr. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)  
(EXAMINADOR INTERNO)**

---

**ANTÔNIO RAPHAEL TEIXEIRA NETO, Prof. Dr. (Universidade de Brasília)  
(EXAMINADOR EXTERNO)**

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à Deus por iluminar o meu caminho.

Aos meus pais, Lilian e Ylani, por todo o incentivo e por me ensinarem os valores da vida;

Às minhas irmãs, Daniele e Tatiana por sempre estarem presentes nos momentos mais importantes da minha vida;

E à toda a minha família, por todo o apoio e carinho.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Arruda de Oliveira pelos ensinamentos, pelo auxílio em todos os momentos e pela confiança depositada em mim.

Ao meu co-orientado Prof. Dr. Ivo Pivato, por todo o apoio oferecido na realização do meu mestrado.

Ao Médico Veterinário Francisco José Gonçalves de Oliveira que me apoiou de forma excepcional e, sem o qual, não seria possível realizar o experimento.

Aos colegas Cristiano Bouéres e Tatiana Pignataro por toda ajuda prestada diretamente na realização deste trabalho.

Agradeço à EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia que, através da Dra Margot Alves Nunes Dode, colaborou para a realização do experimento.

Ao Prof. Dr. Marco Antônio Viu pela realização da análise estatística do experimento e pela receptividade e paciência ao trabalhar comigo.

Agradeço aos proprietários das fazendas Sete Lagoas e Sete Ranchos por cederem os animais do trabalho e aos seus respectivos funcionários pela ajuda na realização do experimento.

Aos animais utilizados no experimento.

Aos amigos que conquistei durante o mestrado, e a todos os meus amigos que me apoiaram e compreenderam a minha ausência durante alguns momentos da realização deste trabalho.

Por último, agradeço à Universidade de Brasília onde, através do Programa de Pós-graduação em Ciências Animais, e à CAPES, pela concessão da bolsa de estudos, que possibilitaram a realização do meu mestrado.

## ÍNDICE

Resumo.....	viii
Abstract.....	x
Capítulo I.....	1
1 – Introdução.....	2
2 – Revisão de Literatura.....	4
2.1 – Ômega 3.....	5
2.2 – Arginina.....	7
2.3 – Vitaminas do Complexo B.....	8
2.4 – L-carnitina.....	8
2.5 – $\beta$ -caroteno/Vitamina A.....	10
2.6 – Antioxidantes.....	11
2.6.1 – Vitamina E.....	12
2.6.2 – Vitamina C.....	13
2.6.3 – Glutathione Peroxidase e Selênio.....	14
2.7 – Considerações finais.....	15
3 – Referências Bibliográficas.....	16
Capítulo II.....	25
1 – Resumo.....	26
2 – Abstract.....	28
3 – Introdução.....	30
4 – Materiais e Métodos.....	32
4.1 – Animais.....	32
4.2 – Delineamento experimental.....	32
4.3 – Colheita e processamento do sêmen.....	34
4.4 – Avaliação do sêmen (fresco, refrigerado e criopreservado).....	35
4.5 – Análise estatística.....	35
5 – Resultados.....	37
6 – Discussão.....	40
7 – Conclusões.....	44
8 – Referências Bibliográficas.....	45

## RESUMO

### **QUALIDADE DO SÊMEN FRESCO, REFRIGERADO E CRIOPRESERVADO EM GARANHÕES SUPLEMENTADOS COM PRODUTO COMERCIAL COMPOSTO POR AMINOÁCIDOS, VITAMINAS, ANTIOXIDANTES E MINERAIS.**

Mariane Leão Freitas<sup>1</sup>, Rodrigo Arruda de Oliveira<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Faculdade de Agronomia e Veterinária – UnB, DF

Objetivou-se com esse estudo avaliar a suplementação de garanhões com um produto comercial fornecido via oral, contendo antioxidantes, ômega 3 e 6, L-carnitina, vitaminas do complexo B, entre outros, na dieta de garanhões, e a sua influência nos parâmetros do sêmen fresco, refrigerado e criopreservado dos animais. Sete garanhões, com histórico reprodutivo conhecido, foram divididos em dois grupos de forma balanceada, levando em consideração a qualidade do sêmen fresco, previamente avaliada. O grupo tratamento (n=3) recebeu 50 mL do produto comercial por 60 dias consecutivos, e o grupo controle (n=4) recebeu 50 mL de solução placebo, no mesmo período. Ao término dos 60 dias de suplementação, foram realizadas três colheitas de sêmen de cada garanhão, em dias alternados, para a avaliação do sêmen fresco, refrigerado e congelado. Avaliou-se a motilidade e a cinética espermática através das variáveis obtidas pela análise espermática computadorizada e a integridade de membrana plasmática e acrossomal através de sondas fluorescentes. Nos animais que receberam o tratamento, observou-se que o sêmen fresco apresentou um aumento ( $P < 0.05$ ) da motilidade total (MT;  $67,14 \pm 5,24$  x  $72,28 \pm 8,13$  %), da motilidade progressiva (MP;  $16,67 \pm 8,69$  x  $22,49 \pm 8,81$  %), da velocidade de trajeto (VAP;  $50,21 \pm 5,30$   $\mu\text{m/s}$ ), da espermatozoides com membrana íntegra (MI;  $72,31 \pm 6,65$  x  $79,27 \pm 5,30$  %) e de espermatozoides com membrana acrossomal íntegra (ISRA;  $68,67 \pm 5,79$  x  $74,67 \pm 6,88$  %). No sêmen refrigerado obteve-se um aumento ( $P < 0.05$ ) da MT, da

VAP, da MI e da ISRA em todos os momentos avaliados (24h, 36h e 48h), nos animais que receberam o produto comercial. Na avaliação do sêmen criopreservado, observou-se um aumento ( $P < 0.05$ ) da MT ( $33,02 \pm 10,88 \times 47,50 \pm 10,61$  %), da MP ( $3,77 \pm 2,75 \times 9,77 \pm 4,54$  %), da VAP ( $39,29 \pm 3,24 \times 44,87 \pm 1,49$   $\mu\text{m/s}$ ) e da velocidade retilínea (VSL;  $31,94 \pm 2,02 \times 35,74 \pm 1,46$   $\mu\text{m/s}$ ), nos animais que receberam o tratamento. Dessa forma, os elementos presentes no produto comercial fornecido para os animais do grupo tratamento, podem ter atuado incrementando a qualidade do sêmen fresco, refrigerado e criopreservado dos garanhões.

Palavras-chave: espermatogênese, fertilidade, inseminação artificial, nutrição, sêmen

## ABSTRACT

### QUALITY OF FRESH, COOLED AND FROZEN-THAWED SEMEN OF STALLIONS SUPPLEMENTED WITH A COMERCIAL PRODUCT COMPOUND OF AMINO ACIDS, VITAMINS, ANTIOXIDANTS AND MINERALS

Mariane Leão Freitas<sup>1</sup>, Rodrigo Arruda de Oliveira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>School of Agronomy and Veterinary Medicine – UnB, DF

The objective of this study was to evaluate the addition of a nutraceutical containing antioxidants, omega 3 and 6, L-carnitine, B-complex vitamins, among others, in the diet of stallions, and their influence on parameters of fresh, cooled and cryopreserved semen. Seven stallions with proven fertility were divided into two groups in a balanced way, taking into account the quality of fresh semen, previously evaluated. The treatment group (n = 3) received 50 mL of the nutraceutical for 60 consecutive days and the control group (n = 4) received 50 ml of placebo solution for the same period. By the end of the 60 days of supplementation, were realized three collections of semen of each stallion, on alternate days, for the assessment of fresh, cooled and cryopreserved semen. Motility and sperm motion kinetics using computerized assisted semen analysis and integrity of acrosome and plasmatic membrane using fluorescent dyes were evaluated. In animals that received treatment, it was observed that the fresh semen showed an improvement (P <0.05) in total motility (MT;  $67.14 \pm 5.24$  x  $72.28 \pm 8.13$  %), of the progressive motility (MP;  $16.67 \pm 8.69$  x  $22.49 \pm 8.81$  %), the average path velocity (VAP;  $50.21 \pm 5.30$   $\mu\text{m/s}$ ), and the integrity of the plasmatic (MI;  $72.31 \pm 6.65$  x  $79.27 \pm 5.30$  %) and acrosome membranes (ISRA;  $68.67 \pm 5.79$  x  $74.67 \pm 6.88$  %). In cooled semen was obtained an increase (P <0.05) of the MT, the VAP, MI and ISRA in all moments of the evaluation (24h,

36h and 48h), in animals that received the commercial product. After the evaluation of cryopreserved semen, there was an increase ( $P < 0.05$ ) of MT ( $33.02 \pm 10.88 \times 47, 50 \pm 10.61\%$ ), MP ( $3.77 \pm 2.75 \times 9, 77 \pm 4.54\%$ ), VAP ( $39.29 \pm 3.24 \times 44.87 \pm 1.49 \mu\text{m/s}$ ), and straight line velocity (VSL;  $31.94 \pm 2.02 \times 35.74 \pm 1.46 \mu\text{m/s}$ ), in animals receiving treatment. Thus, the elements present in the commercial product supplied for the animals on the treatment group, may have acted improving the quality of fresh semen, cooled and cryopreserved of the stallions.

**Keywords:** artificial insemination, fertility, nutrition, semen, spermatogenesis

## **CAPÍTULO I**

## 1 INTRODUÇÃO

A equideocultura é um setor de grande importância na economia brasileira. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2014) e da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2013), existem mais de 7,5 milhões de equídeos no território brasileiro, sendo 5.437.000 equinos, 1.239.000 muares e 915.000 asininos. De acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2015), o Brasil possui o maior rebanho de equinos da América Latina e o terceiro maior rebanho do mundo. Movimentando cerca de 7,3 bilhões de reais, com a produção de cavalos. Dessa forma, o chamado Complexo do Agronegócio Cavalos, é responsável pela geração de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos no país.

Ao longo dos anos, a ampla utilização de técnicas associadas à reprodução animal trouxe muitos benefícios aos criadores de equídeos, como a possibilidade de aumentar o número de produtos geneticamente superiores nascidos por ano (Gomes & Gomes, 2009). Comercialmente, é sempre desejável a utilização de garanhões com sêmen de alta qualidade, uma vez que uma grande proporção de células viáveis é perdida entre a colheita do sêmen e o procedimento de inseminação artificial, particularmente no armazenamento do sêmen a longo prazo. No entanto, é comum obtermos ejaculados de baixa qualidade, contendo um elevado número de espermatozoides com defeitos, provenientes de garanhões subfêrteis ou com idade avançada (Stradaioli et al., 2004).

A refrigeração e a criopreservação dos espermatozoides podem induzir injúrias celulares, que estão associadas ao rompimento de membranas lipídicas, resultando em danos às mitocôndrias e perda da integridade de membrana plasmática e acrossomal (Parks & Graham,

1992). Esses eventos são seguidos por perda da motilidade, viabilidade e capacidade de congelamento do espermatozoide, um fenômeno conhecido como choque térmico pelo frio (Watson, 2000). O espermatozoide equino apresenta, quando comparado a outras espécies de animais domésticos, uma maior sensibilidade ao choque térmico pelo frio e ao estresse osmótico (Costa et al., 2004).

Dessa forma, se faz necessária a busca por tratamentos que possam ser aplicados para melhorar a qualidade do sêmen de animais que apresentam um baixo índice reprodutivo, permitindo que animais valiosos sejam utilizados na reprodução (Stradaioli et al., 2004). Com esse intuito, alguns trabalhos vem sendo realizados com a implementação de nutracêuticos na dieta de garanhões com a finalidade de melhorar seus parâmetros espermáticos e a qualidade do sêmen armazenado, refrigerado ou criopreservado (Stradaioli et al., 2000; Stradaioli et al., 2004; Brinsko et al., 2005; Deichsel et al., 2008; Contri et al., 2011; Garmsir et al, 2014; Schmid-Lausingk & Aurich, 2014).

Objetivou-se avaliar se a suplementação oral de garanhões, com um produto comercial, melhora a qualidade do sêmen de garanhões, através da avaliação de parâmetros do sêmen fresco, refrigerado e criopreservado.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

De todas as biotecnologias utilizadas na reprodução animal, a inseminação artificial (IA) é a mais antiga, mais simples e de maior impacto na produção animal. Esta técnica difundiu-se em todo o mundo como um instrumento eficaz e econômico para ser utilizado no melhoramento genético. Entretanto, para que se obtenha sucesso em programas de IA, alguns cuidados devem ser tomados em relação aos machos reprodutores. Cuidados com o manejo, um bom controle sanitário, e condições nutricionais que atendam às necessidades reprodutivas destes animais, são essenciais para que se possa alcançar um bom resultado (Reichenbach et al., 2008).

A espermatogênese, processo de formação do gameta masculino, que acontece nos testículos, mais especificamente nos túbulos seminíferos, demanda que a função de todos os sistemas do organismo esteja balanceada, tendo em conhecimento a sensibilidade do epitélio germinativo. Está estabelecido que fatores ambientais podem alterar a secreção hormonal, a diferenciação celular nos testículos, além da maturação e o transporte dos espermatozoides no epidídimo. Diante de fatores adversos, órgãos reprodutivos apresentam degeneração e distúrbios em diferentes graus e intensidades, temporários ou permanentes, assim, determinando uma maior ou menor influência na fertilidade do animal (Arruda et al., 2010).

Com a intenção de otimizar a utilização de nutrientes em algumas vias metabólicas, a indústria tem disponibilizado no mercado uma série de substâncias, chamadas de nutracêuticos que atuam influenciando positivamente o desempenho reprodutivo dos animais (Arruda et al., 2010).

Nutracêuticos são suplementos alimentares que fornecem uma forma concentrada de um respectivo agente bioativo, obtido a partir de um alimento, porém apresentado em uma matriz não-alimentar, e usado em doses que excedem às encontradas normalmente na dieta, com a finalidade de melhorar a saúde (Zeisel, 1999; Dharti et al., 2010).

Dessa forma, o nutracêutico situa-se entre os alimentos e os produtos farmacêuticos, sendo usado, como um termo abrangente, incluindo alimentos de origem vegetal e seus subprodutos, minerais e vitaminas (Ko & Sabanegh, 2014). Entre os principais nutracêuticos citados na literatura que são utilizados na reprodução do macho estão: o ômega-3, a arginina, as vitaminas do complexo B, a L-carnitina, o  $\beta$ -caroteno e os antioxidantes.

## 2.1 Ômega 3

O sêmen de todas as espécies domésticas contém altos níveis de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), em particular o ácido docosahexaenóico (DHA; 22:6 n-3, um ácido graxo ômega 3) e o ácido docosapentaenóico (DPA; 22:5 n-6, um ácido graxo ômega 6). Esses ácidos graxos são essenciais para a estrutura, função e integridade da membrana plasmática dos espermatozoides (Colenbrander et al., 1999). Dessa forma, a conservação desta membrana é essencial para a contínua viabilidade celular (Grady et al., 2009).

O estresse físico relacionado ao armazenamento refrigerado e criopreservado do sêmen, é uma das principais causas de danos à membrana plasmática dos espermatozoides (Pena et al., 2011). O espermatozoide de garanhões contém 14% de lipídeos, enquanto o plasma seminal contém 2,1 % de lipídeos (Komarek et al., 1965). Fosfolipídios são os principais componentes lipídicos do espermatozoide e são, em grande parte, compostos por ácidos graxos poliinsaturados (Scott, 1999).

Uma vez que os animais não são capazes de sintetizar os PUFAs a partir de ácidos graxos saturados ou monoinsaturados, devem adquiri-los a partir de PUFAs precursoras na sua dieta. A transferência de PUFAs adquiridos na dieta para a membrana plasmática do espermatozoide tem demonstrado ser eficaz num certo número de espécies como pequenos ruminantes (Drokin et al, 1999) e humanos (Conquer et al, 2000). Uma redução da fertilidade durante o envelhecimento foi associada a uma diminuição da proporção de PUFAs específicos dos fosfolipídeos espermáticos tanto em espermatozoides de touros (DHA; Kelso et al., 1997), quanto em espermatozoides de galos (C20-22 PUFA; Cerolini et al., 1997).

Altos níveis de PUFAs aumentam a susceptibilidade das células aos danos induzidos por radicais livres, o que é considerada uma importante causa da infertilidade no homem (Aitken, 1994). Segundo Gliozzi et al. (2009), é fundamental levar em consideração

um balanceamento crítico entre lipídeos, espécies reativas ao oxigênio e os diferentes componentes do sistema antioxidante da célula, para garantir uma eficiente funcionalidade do espermatozoide.

Estudos em gananhões, demonstraram que uma alta proporção de DHA em relação ao DPA resulta em uma maior fertilidade, enquanto altos níveis de DPA em relação ao DHA resulta em uma menor fertilidade (Brinsko et al., 2005). Em humanos azoospermicos, foi descoberto, que o nível de DHA no plasma seminal, assim como a proporção de ácidos graxos ômega-3 em relação aos ácidos graxos ômega-6 nos espermatozoides é menor que em homens normospermicos (Conquer et al., 1999).

Yeste et al. (2011), compararam o efeito da suplementação de ômega-3 durante 26 semanas na dieta de três diferentes raças de cachorros (Pietrain, Duroc e Large White). E constataram que apenas as raças Pietrain e Large White foram afetadas pela suplementação. Foi observada melhora na morfologia espermática das duas raças, e melhora na integridade acrossomal e mitocondrial da raça Pietrain. A raça Duroc não sofreu nenhuma influência da suplementação na dieta. Dessa forma, esses autores puderam concluir que existem diferenças na resposta perante à suplementação nutricional de cada raça, em relação à qualidade seminal. Isso pode ser explicado por existirem particularidades na composição da membrana plasmática dos espermatozoides de animais de diferentes raças.

Grady et al. (2009), observaram que a suplementação de ácido docosahexaenóico na dieta de gananhões, pode aumentar a produção diária de espermatozoides, a qualidade de sêmen refrigerado e criopreservado. Possivelmente devido a um aumento de conteúdo de DHA na membrana plasmática do espermatozoide. O efeito foi ampliado nos gananhões inicialmente com ejaculados de baixa qualidade.

Schmid-Lausigk e Aurich (2014), investigaram a adição de óleo de linhaça (ômega-3 e ômega-6) em associação com antioxidantes na dieta de gananhões, durante o inverno rigoroso. Avaliaram o efeito da suplementação na motilidade e integridade de membrana plasmática, para sêmen refrigerado e criopreservado. Segundo os autores, durante o inverno, podem ocorrer alterações na composição lipídica da membrana plasmática dos espermatozoides, devido à mudanças na fisiologia reprodutiva, levando à uma queda da qualidade do sêmen dos gananhões. Concluiu-se que o tratamento atenuou a queda da motilidade e da integridade de membrana plasmática, do sêmen refrigerado, dos gananhões que receberam a suplementação. Porém, não evitou a queda da qualidade seminal do sêmen criopreservado, ao término do inverno.

## 2.2 Arginina

Arginina é um aminoácido, que faz parte da síntese do óxido nítrico. O óxido nítrico é um gás formado em meio aquoso através da conversão da arginina, na presença de oxigênio e diversos co-fatores (Knowles et al, 1989). O óxido nítrico participa de mecanismos fisiológicos muito importantes, agindo como mensageiro intracelular no controle do tônus vascular, na neurotransmissão, na produção de hormônios, na diferenciação celular, na expressão gênica e na ativação de células do sistema imune (O'Bryan et al., 1998).

O óxido nítrico atua no hipotálamo, estimulando a liberação do hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH) e inibindo a liberação de ocitocina. O GnRH, no nível hipofisário, estimula a liberação dos hormônios luteinizante e folículo-estimulante. Uma diminuição da concentração do óxido nítrico hipotalâmico pode causar danos à função reprodutiva, já que ele é um dos responsáveis pelo funcionamento do eixo reprodutivo, sendo de fundamental importância para a reprodução normal (McCann et al., 1999).

A presença do óxido nítrico no líquido seminal também é fundamental para que os espermatozoides tenham plena capacidade de desempenhar sua função de gameta. Além disso, no aparelho reprodutor, o óxido nítrico desempenha um controle no relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso peniano e seus vasos sanguíneos aferentes (Adams, 1996), facilitando a ereção (Dusse et al., 2003).

Porém, quando ocorre uma excessiva produção do óxido nítrico, o seu poder oxidativo não só causa danos à estrutura do gameta, como também diminui sua mobilidade e sua vitalidade. Mas, em contrapartida, concentrações muito baixas podem dificultar o processo de fertilização e o início da divisão celular do novo embrião (Carvalho et al., 2002).

Relatos do efeito da arginina sobre os parâmetros do sêmen variam na literatura. Alguns estudos descrevem que a suplementação diária de arginina melhora a concentração e a motilidade espermática (Holt & Albanese, 1944; Tanimura, 1967; Schachter et al., 1973; De-Aloysio et al., 1982; Schibona et al., 1994), enquanto outros autores não obtiveram sucesso em demonstrar qualquer melhora nas características espermáticas ou na taxa de prenhez (Miroueh, 1970; Pryor et al., 1978). Existem, ainda, trabalhos que demonstraram que as concentrações excessivas de arginina podem resultar em uma diminuição da função espermática (Srivastava & Agarwal, 2010).

### **2.3 Vitaminas do complexo B**

A vitamina B12 (cobalamina) é uma vitamina hidrossolúvel, sendo um componente próprio do organismo e do metabolismo animal (Solomon, 2007). A função primordial da vitamina B12 consiste em atuar como coenzima para diminuir os ribonucleotídeos a desoxiribonucleotídeos, passo essencial na replicação dos genes. Além disso, a vitamina B12 atua na estimulação do crescimento, na estimulação da síntese e maturação celular e ajuda a manter a estabilidade da cromatina do DNA. A deficiência da vitamina B12 leva ao acúmulo do ácido metilmalônico, que afeta e interrompe o metabolismo mitocondrial, levando a produção excessiva de espécies reativas ao oxigênio (EROs; Al-Maskari et al., 2012).

O ácido fólico (vitamina B9), é outra vitamina hidrossolúvel do complexo B, desempenha um papel importante na síntese de DNA, através da síntese de purinas e timinas (Al-Maskari et al., 2012). A ingestão adequada de ácido fólico está associada a uma diminuição da frequência de alterações do DNA em espermatozoides (Young et al., 2008).

O ácido fólico está intimamente ligado à vitamina B12, pois depende dela para cumprir a sua função (Al-Maskari et al., 2012). Devido a isso, a combinação do ácido fólico e das cobalaminas em programas de suplementação, beneficia e maximiza o impacto dessas vitaminas, levando em consideração que a vitamina B12 torna o ácido fólico mais biodisponível, e que a deficiência da cobalamina torna o ácido fólico indisponível ao organismo (Reynolds, 2006; Solomon, 2007).

Consequentemente, a deficiência desses dois fatores leva à anormalidades cromossômicas e ao aumento de EROs, gerando um risco de mutações genéticas (Al-Maskari et al., 2012).

### **2.4 L-carnitina**

Outro componente dos nutracêuticos voltados para a reprodução é a L-carnitina. A L-carnitina é sintetizada no fígado, rim e cérebro, através da conversão de dois aminoácidos essenciais: lisina e metionina (Hulse et al., 1978; Jeulin et al., 1994). No trato genital do macho, a carnitina está concentrada no epidídimo e nos espermatozoides. No entanto, no sêmen

ejaculado, a maior parte da L-carnitina e da L-acetilcarnitina é encontrada no plasma seminal (Bohmer et al., 1978).

A L-carnitina e a L-acetilcarnitina desempenham um papel vital no metabolismo do espermatozoide, fornecendo energia prontamente disponível, o que afeta de forma positiva a motilidade, a maturação dos espermatozoides e a espermatogênese. Esse efeito positivo é mediado pelo transporte de ácidos graxos de cadeia longa, através da membrana mitocondrial interna, para a utilização no metabolismo através da  $\beta$ -oxidação (Hulse et al., 1978; Jeulin et al., 1994; Matalliotakis et al., 2000; Palmero et al., 2000).

A L-carnitina, nos mamíferos, é transportada do plasma sanguíneo para o lúmen do epidídimo de forma ativa (Yeung et al., 1980), e finalmente se acumula nos espermatozoides, na sua forma livre ou acetilada, a L-acetilcarnitina. Em geral, o trato genital do macho contém compartimentos que mantêm altas concentrações de carnitina na sua forma livre, como o tecido epididimário, o plasma seminal e os espermatozoides (Agarwal & Said, 2004). A maior concentração de carnitina é encontrada na cauda do epidídimo, onde os espermatozoides adquirem a capacidade de se tornarem móveis (Hinton et al., 1979).

Os ácidos graxos devem sofrer uma ativação (se ligando à coenzima A [CoA], para formar a acil-CoA) para entrarem na mitocôndria. Moléculas de cadeias longas de acil-CoA são incapazes de atravessar a membrana mitocondrial interna, portanto, precisam usar um mecanismo enzimático específico, que utiliza a L-carnitina como transportadora (Bremer, 1983; Jeulin et al., 1994; Jeulin & Lewin, 1996).

Para realizar o seu papel, a carnitina precisa do correto funcionamento de algumas aciltransferases de cadeias longas, vinculadas à membrana mitocondrial, como a acilcarnitina transferase I e II, e a acilcarnitina translocase (Bieber, 1988).

Ao proporcionar um sistema de transporte para os ácidos graxos livres e para derivados de acetil-CoA para o interior da mitocôndria, a L-carnitina regula o fluxo dos grupos acilo e, portanto, o equilíbrio energético através das membranas celulares. Durante a sua passagem celular, os grupos acilo são temporariamente transferidos para a L-carnitina, produzindo a L-acetilcarnitina. De modo similar, a carnitina facilita o transporte de grupos acetilo por meio da L-acetilcarnitina (Bahl & Bresler, 1987).

Após ser transportada para dentro da mitocôndria, o grupo acilo é transferido para a CoA mitocondrial (Lenzi et al., 2004). O resultado final dessas reações é uma modulação das concentrações mitocondriais de CoA, envolvida em diversas vias metabólicas, tais como o ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo de Krebs), a  $\beta$ -oxidação de ácidos orgânicos e a degradação oxidativa de aminoácidos (Bahl & Bresler, 1987).

Foi levantada a hipótese que, a elevada concentração de carnitina, presente no fluido epididimário, mantém os espermatozoides em estado quiescente (Rufo et al., 1984; Deana et al., 1989). A observação de que elevadas concentrações de carnitina inibem o efluxo celular de enzimas e o consumo de oxigênio, e aumenta a viabilidade celular, sugere fortemente que a carnitina tem efeito na estabilização das membranas plasmáticas (Jenkins and Griffith, 1986).

Além disso, as carnitinas também exercem um papel de proteção contra espécies reativas ao oxigênio, exercendo propriedades antioxidantes primárias e secundárias (Agawal & Said, 2004). Essas propriedades ocorrem como um resultado do mecanismo de reparação, pelo qual, uma quantidade elevada e tóxica de acetil-coenzima A (acetil-CoA) intracelular é removida, e ácidos graxos de fosfolípidios da membrana são substituídos (Vicari & Calogero, 2001; Vicari et al., 2002).

Nos homens, a quantidade de L-carnitina no plasma seminal está relacionada com a concentração e a motilidade progressiva dos espermatozoides (Menchini-Fabris et al., 1984; Borman et al., 1989). Foi relatada uma redução significativa da concentração da carnitina no sêmen de pacientes com azoospermia, afetados pela agenesia bilateral dos ductos deferentes e obstrução do epidídimo (Menchini-Fabris et al., 1984; Casano et al., 1987). A redução de carnitina no plasma seminal também foi relatada em pacientes inférteis (Zöpfgen et al., 2000). A correlação positiva entre os parâmetros seminais e concentração de carnitina no sêmen, permite propor que a carnitina é um marcador de "boa qualidade" do sêmen (Menchini-Fabris et al., 1984).

## **2.5 $\beta$ -caroteno/Vitamina A**

A vitamina A, também conhecida como carotenóides ou retinóides, é uma vitamina solúvel em gordura, que é exigida para a manutenção do epitélio que recobre todos os canais, cavidades e áreas de exposições externas, onde atua diretamente na síntese de mucopolissacarídeos (Bertechini, 1997). Dessa forma, sendo responsável pela manutenção das membranas mucosas dos olhos, do trato gastrointestinal e do trato geniturinário, além da pele (Kamal-Eldin & Appelgvist, 1996). A queratinização dos epitélios é o resultado da perda de sua capacidade secretora, tornando-os secos e susceptíveis às infecções (Bertechini, 1997).

A vitamina A, na forma de retinol, retinal ou ácido retinóico somente é encontrada no organismo do animal e seus produtos. Porém, plantas produzem pigmentos amarelos chamados de carotenoides (provitamina A), que podem ser convertidos em vitamina A na mucosa intestinal e no fígado, havendo uma eficiência que varia de acordo com a espécie, sendo o  $\beta$ -caroteno a provitamina A mais importante (Bertechini, 1997).

Na literatura, pode-se achar que  $\beta$ -caroteno age beneficemente no organismo da mesma forma que a vitamina A, sendo essencial para os tecidos epiteliais que funcionam em órgãos reprodutivos (Arikan & Rodway, 2000). Na reprodução, a vitamina A atua na síntese de hormônios esteroidais a partir do colesterol orgânico, nas gônadas, placenta e adrenais. Em caso de deficiência, ocorrem alterações histológicas dos órgãos reprodutivos de machos e fêmeas, tornando as glândulas atroficas (Bertechini, 1997).

Dessa forma, a vitamina A exerce uma influência marcante no complexo reprodutivo do macho, atuando como: protetora do epitélio testicular pela ação na gametogênese; estimuladora da libido e vigor sexual, conjuntamente com as vitaminas C e do complexo B; e potencializando o volume e porcentagem de espermatozoides vivos no ejaculado (Rillo, 1982).

Segundo Rillo (1982), a deficiência de vitamina A dá origem a vacuolização das células basófilas, chegando a degenerar e impedir a elaboração dos fatores gonadotróficos e, como consequência, inibindo a produção espermática.

Os primeiros estudos mostraram que a espermatogênese é influenciada pela deficiência de vitamina A em ratos. Em animais com deficiência desta vitamina, os túbulos seminíferos contêm apenas células de Sertoli, espermatogônias e alguns espermátocitos, estando ausentes as células germinativas em desenvolvimento que são fundamentais para a espermatogênese (Wolbach & Howe, 1925; Mason, 1933).

## **2.6 Antioxidantes**

Como todas as células que vivem em condições aeróbias, os espermatozoides produzem espécies reativas ao oxigênio (EROs), como resultado do metabolismo normal do oxigênio (Lamirande et al., 1997). A membrana plasmática dos espermatozoides de mamíferos contém uma elevada concentração de ácidos graxos poliinsaturados de cadeias longas, por esse

motivo, os espermatozoides são altamente suscetíveis à peroxidação lipídica (Jones & Mann, 1973; Aitken et al., 1993).

Em condições normais, a maioria das espécies reativas ao oxigênio são continuamente neutralizadas por captadores de baixo peso molecular ou enzimáticos, contidos nos espermatozoides e no plasma seminal (Lamirande et al., 1997). O estresse oxidativo surge como uma consequência da excessiva produção de EROs, que resulta em uma diminuição dos níveis de ATP intracelular, levando à peroxidação lipídica da membrana plasmática do espermatozoide (Almeida & Ball, 2005).

A partir da peroxidação lipídica pode ocorrer a diminuição da integridade da membrana plasmática, danos ao DNA, diminuição da capacidade intrínseca do espermatozoide de reparar danos ao DNA (Ryan et al., 1990), e diminuição da motilidade espermática (Kao et al., 2008). Apesar dos efeitos negativos do excessivo estresse oxidativo, as espécies reativas ao oxigênio fisiológicas, são essenciais para determinadas funções dos espermatozoides, incluindo a capacitação espermática (Lamirande & Lamothe, 2009).

Os espermatozoides de mamíferos possuem um sistema intracelular de defesa antioxidante contra as EROs que consiste, principalmente, de enzimas como: superóxido dismutase, catalase, glutatona transferase e glutatona peroxidase (GPx), bem como antioxidantes não enzimáticos como: o ácido ascórbico (vitamina C), o  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), glutatona reduzida e urato (Cotgreave et al., 1988; Aitken, 1995).

### **2.6.1 Vitamina E**

A vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), é uma vitamina lipossolúvel, que atua como um potente antioxidante, agindo ao nível das membranas celulares (Ford & Whittington, 1998). O  $\alpha$ -tocoferol protege a membrana plasmática dos espermatozoides, inibindo danos induzidos por radicais livres, prevenindo a peroxidação lipídica, e melhorando a atividade de outros antioxidantes (Palamandra & Kehrer, 1993; Brigelius-Flohe & Traber, 1999). É eficiente na remoção de radicais peroxil sendo, portanto, capaz de interromper a cadeia de reações envolvendo esse radical livre (Virgini et al., 2011).

De acordo com Virgini et al. (2011), outras funções do  $\alpha$ -tocoferol se relacionam à estabilização da membrana plasmática, por meio da formação de complexos envolvendo os produtos da hidrólise da vitamina E e os ácidos graxos livres da membrana plasmática.

Segundo Surai et al. (2000), a criopreservação e o descongelamento do sêmen estão relacionados a uma significativa redução na motilidade espermática induzida por EROs, e esses efeitos podem ser combatidos de forma eficaz através da adição da vitamina E a crioprotetores.

### **2.6.2 Vitamina C**

O ácido ascórbico (vitamina C), é outro componente não enzimático que atua como antioxidante. A vitamina C é uma vitamina hidrossolúvel, que é conhecida por remover eficazmente os radicais hidroxilo, superóxido e o peróxido de hidrogênio, além de desempenhar um importante papel na reciclagem da vitamina E oxidada (Kefer, et al., 2009). Foi demonstrado que em adequadas concentrações, a vitamina C reduz a fragmentação e danos gerados ao DNA do espermatozoide. (Mendiola et al., 2010, Greco et al., 2005, Colagar & Marzony, 2009). Ela pode ser encontrada em altas concentrações no plasma seminal, sendo proporcional ao seu consumo (Dawson et al., 1987).

A eficiência do ácido ascórbico como antioxidante foi demonstrada em estudos onde a suplementação de ácido ascórbico teve efeitos benéficos sobre as características do sêmen e os níveis de testosterona em coelhos (Salem et al., 2001). Foi sugerido por Thiele et al. (1995) que as concentrações de ácido ascórbico no plasma seminal humano estão correlacionadas, positivamente, com as porcentagens de espermatozoides morfolologicamente normais e também foi sugerido que esta vitamina é protetora do epidídimo, através da proteção das membranas celulares pelo seu efeito antioxidante.

Chinoy et al. (1986) relataram que o ácido ascórbico é importante para a manutenção fisiológica da integridade dos testículos, epidídimo e glândulas acessórias e a deficiência de vitamina C nas dietas causariam rápida degeneração do sistema reprodutivo como um todo, como foram demonstrados pelos autores nas espécies de porcos da Índia.

Sonmez et al. (2005) investigaram os efeitos da suplementação de ácido ascórbico sobre a qualidade do sêmen, peroxidação lipídica e os níveis de testosterona no plasma sanguíneo de ratos Wistar. Os autores concluíram que a suplementação do ácido ascórbico não aumentou o peso corporal, o peso dos testículos, epidídimo, vesículas seminais e próstata, mas a suplementação aumentou, significativamente, a concentração de ácido

ascórbico nos testículos e plasma sanguíneo, diminuindo, consideravelmente, os níveis de peroxidação lipídica.

### **2.6.3 Glutationa peroxidase e Selênio**

Dentre os sistemas enzimáticos, destaca-se a Glutationa Peroxidase (GPx) que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e de outros peróxidos orgânicos (peróxidos de lipídios na membrana celular) para seus álcoois correspondentes. Convertendo Glutationa – forma reduzida (GSH) à Glutationa – forma oxidada (GSSG), que contem duas moléculas ligadas por uma ligação dissulfeto. A GPx contém um átomo de selênio ligado, covalentemente, na forma de selenocisteína, que é essencial para que essa enzima exerça a sua função (Nordberg & Árner, 2001; Maiorino et al., 2003).

Em mamíferos existe GPx de 1 a 4. A GPx 4 tem dupla função na célula espermática: é enzimaticamente ativa na espermátide e funciona como uma proteína estrutural no espermatozoíde maduro. A GPx 4 também pode reagir com o peróxido de hidrogênio e uma ampla variedade de hidroperóxidos de lipídios sendo, portanto, considerada responsável pela proteção da membrana plasmática dos espermatozoides contra os danos oxidativos (Imai & Nakagawa, 2003).

Nos testículos, a GPx 4 encontra-se presente em três diferentes isoformas que são derivadas dos mesmos genes e localizadas no citosol, na mitocôndria e no núcleo celular. Tendo a função de ajudar no desenvolvimento dos espermatozoides, através da proteção contra espécies reativas ao oxigênio. Em estudos realizados em humanos, foi constatado que homens com baixa fertilidade devido à reduzida concentração e pobre qualidade dos espermatozoides, continham pouca GPx nos espermatozoides (Beckett & Arthur, 2005).

O selênio é encontrado em diversas formas, e tem sido reconhecido como essencial para a reprodução. Ele desempenha um papel de grande importância na fertilidade masculina, não apenas por participar da regulação de várias funções fisiológicas, incluindo a proteção ao espermatozoide através da ação antioxidante, e a estabilização da membrana do espermatozoide, mas também por ser essencial na síntese da testosterona (Crimmel et al., 2001).

O selênio é um componente da glutaciona peroxidase e serve como um cofator para a redução de enzimas antioxidantes (Brown & Arthur, 2001). De acordo com Hafeman et

al. (1974), a atividade da glutathiona peroxidase, nos tecidos de ratos, cai drasticamente em animais com dietas deficientes em selênio e aumenta quando ocorre a reposição do selênio.

Além disso, o selênio possui um papel importante na manutenção do desenvolvimento testicular, na espermatogênese, e nas funções espermáticas, como na motilidade e na capacitação espermática (Ursini et al., 1999). Os efeitos negativos da deficiência de selênio incluem a diminuição da motilidade espermática, diminuição da estabilidade da peça intermediária do espermatozoide e o desenvolvimento anormal dos espermatozoides, resultando em uma taxa elevada de defeitos morfológicos (Watanabe & Endo, 1991; Noack-Fuller et al., 1993).

Foi observado que o selênio aumenta a concentração espermática, a motilidade e diminui o número de defeitos morfológicos, quando usado de forma isolada, ou em combinação com outros antioxidantes e suplementos (Vezina et al., 1996; Safarinejad & Safarinejad, 2009). A vitamina E desempenha um papel no metabolismo do selênio e atua em sinergia com as propriedades antioxidantes do selênio (Burton & Traber, 1990).

## **2.7 Considerações finais**

O cuidado com a nutrição dos animais, é fundamental para a obtenção de bons resultados dentro da reprodução. Existem alguns produtos, que apresentam na sua formulação uma diversidade de substâncias nutracêuticas, com o intuito de melhorar o desempenho de animais voltados para a reprodução. Mas temos que levar em consideração, que as respostas aos nutracêuticos variam para cada indivíduo, e de acordo com a espécie, com a raça, com a idade, com o ambiente e com os fatores nutricionais. Muitos estudos foram realizados para a avaliar a utilização de nutracêuticos na reprodução do macho, tanto em humanos, quanto em animais. Porém, não existe uma padronização em relação a metodologia empregada nesses estudos e, conseqüentemente, nos resultados obtidos. Dessa forma, se faz necessária a realização de mais estudos, onde cada nutracêutico seja avaliado de forma independente, dentro de cada espécie. Para que seja possível determinarmos a verdadeira função de cada substância, dentro do sistema reprodutor do macho e, assim, definir a dose ideal de cada nutracêutico de acordo com a espécie, ou a raça, de interesse.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, H.R. Physiologic, pathophysiologic, and therapeutic implications for endogenous nitric oxide. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.209, p.1297-1302, 1996.
- AGARWAL, A.; SAID, T.M. Carnitines and male infertility. *Reproductive BioMedicine Online*, v.8, n.4, p.376-384, 2004.
- AITKEN, R.J. A free radical theory of male infertility. *Reproduction, Fertility and Development*, v.6, p.19-24, 1994.
- AITKEN, R.J.; HARKISS, D.U.; BUCKINGHAM, D.E. Analysis of lipid peroxidation mechanism in human spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, v.35, p.302-315, 1993.
- AITKEN, R.; PATTERSON, M.; FISCHER, H. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role on the control of human sperm function. *Journal of Cell Science*, v.108, p.2017-2025, 1995.
- ALMEIDA, J.; BALL, B.A. Effect of  $\alpha$ -tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v.87, p.321-337, 2005.
- AL-MASKARI, M. Y.; MOSTAFA, I.; WALY, M. P. H.; AMANAT, ALI; YUSRA, S.; AL-SHUAIBI; ALLAL OUHTIT, M. P. H. Folate and vitamin B12 deficiency and hyperhomocysteinemia promote oxidative stress in adult type 2 diabetes. *Nutrition*, v.28, p.e23-e26, 2012.
- ARIKAN, S.; RODWAY, R.G. Effect of cyclodextrin-encapsulated  $\beta$ -carotene on progesterone production by bovine luteal cells. *Animal Reproduction Science*, v.64, p.149-160, 2000.
- ARRUDA, R.P.; SILVA, D.F.; ALONSO, M.A.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; GALLEGO, A.M.; MARTINS, S.M.M.K.; GRANATO, T.M. Nutraceuticals in reproduction of bulls and stallions. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.39, p.393-400, 2010.
- BAHL, J.; BRESLER, R. The pharmacology of carnitine. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v.27, p.257-277, 1987.

- BECKETT, G.J.; ARTHUR, J.R. Selenium and endocrine systems. *Journal of Endocrinology*, v.184, p.455-465, 2005.
- BERTECHINI, A. G. Nutrição de monogástricos. Lavras: Ed FAEPE/UFLA, 1997, p.255.
- BORMAN, M.S.; du TOIT, D.; OTTO, B.; MULLER, H.; HURTER, P.; du PLESSIS, D. J. Seminal carnitine, epididymal function and spermatozoal motility. *South African Medical Journal*, v.75, p.20-21, 1989.
- BIEBER, L.L. Carnitine. *Annual Review of Biochemistry*, v.57, p.261-283, 1988.
- BOHMER, T.; HOEL, P.; PURVIS, K.; HANSSON, V. Carnitine levels in human accessory sex organs. *Archives of Andrology*, v.1, p.53-59, 1978.
- BORMAN, M.S.; du TOIT, D.; OTTO, B.; MULLER, H.; HURTER, P.; du PLESSIS, D.J. Seminal carnitine, epididymal function and spermatozoal motility. *South African Medical Journal*, v.75, p.20-21, 1989.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2015. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos>> acesso em: 28/07/2015.
- BREMER, J. Carnitine – metabolismo and functions. *Physiological Reviews*, v.63, p.1420-1480, 1983.
- BRIGELIUS-FLOHE, R.; TRABER, M. G. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB Journal*, v.13, p.1145-1155, 1999.
- 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, K. M.; ARTHUR, J. R. Selenium, selenoproteins and human health: a review. *Public Health Nutrition*, v.4, p.593-599, 2001.
- BURTON, G.W.; TRABER, M. G. Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Annual Review of Nutrition*, v.10, p.357-382, 1990.
- CARVALHO, O. F.; FERREIRA, J. D. J.; SILVEIRA, N. A.; FRENEAU, G. E.; Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v.38, n.1, p.33-38, 2002.
- CASANO, R.; ORLANDO, C.; CALDINI, A.L.; BARNI, T.; NATALI, A.; SERIO, M. Simultaneous measurement of seminal l-carnitine, a,1-4-glucosidase, and glycerylphosphorylcholine in azoospermic and oligozoospermic patients. *Fertility and Sterility*, v.47, p.324-328, 1987.
- CEROLINI, S.; KELSO, K.A.; NOBLE, R.C.; SPEAKE, B.K.; PIZZI, F.; CAVALCHINI, L.G. Relationship between spermatozoan lipid composition and fertility during aging of chickens. *Biology of Reproduction*, v.57, p.976-980, 1997.

- CHINOY, N.J.; BUCH-NEE, R.P.; MEHTA, R.R.; SEETHALAKSHMI, L.; SHARMA, J. D.; CHINOY, M. R. Effects of vitamin C deficiency on physiology of male reproductive organs of guinea pigs. *International Journal of Fertility*, v.31, p.232-239, 1986.
- COLAGAR, A. H.; MARZONY, E. T. Ascorbic acid in human seminal plasma: determination and its relationship to sperm quality. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, v.45, p.144-149, 2009.
- COLENBRANDER, B.; FAZELI, A.R.; VAN BUITEN, A.; PARLEVLIET, J. GADELLA, B.M. Assessment of sperm cell membrane integrity in the horse. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.88 (Suppl.), p.49, 1999.
- CONQUER, J.A.; MARTIN, J.B.; TUMMON, I.; WATSON, L.; TEKPETEY, F. Fatty acid analysis of blood, serum, seminal plasma, and spermatozoa of normozoospermic vs. asthenozoospermic males. *Lipids*, v.34, p.793-799, 1999.
- CONQUER, J.A.; MARTIN, J.B.; TUMMON, I.; WATSON, L.; TEKPETEY, F. Effect of DHA supplementation on DHA status and sperm motility in asthenozoospermic males. *Lipids*, v.35, p.149-154, 2000.
- CONTRI, A.; AMICIS, I.; MOLINARI, A.; FAUSTINI, M.; GRAMENZI, A.; ROBBE, D.; CARLUCCIO, A. Effect of dietary antioxidant supplementation on fresh semen quality in stallion. *Theriogenology*, v.75, p.1319-1326, 2011.
- COSTA, M.D.; BERGMANN, J.A.G.; REZENDE, A.S.C. et al. Caracterização demográfica da raça Mangalarga Marchador. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.56, p.687-690, 2004.
- COTGREAVE, I.A.; MOLDEUS, P.; ORRENIUS, S. Host biochemical defense mechanisms against prooxidants. *Annual Review Pharmacology Toxicology*, v.28, p.189-212, 1988.
- CRIMMEL, A. S.; CONNER, C. S.; MONGA, M. Withered yang: a review of traditional Chinese medical treatment of male infertility and erectile dysfunction. *Journal of andrology*, v.4, p.173-182, 2001.
- DAWSON, E.B.; HARRIS, W. A.; RANKIN, W. E.; CHARPENTIER, L. A.; MCGANITY, W. J. Effect of ascorbic acid on male fertility. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.498, p.312-323, 1987.
- DE-ALOYSIO, D.; MANTUANO, R.; MAULONI, M.; NICOLETTI, G. The clinical use of arginine aspartate in male infertility. *Acta Europaea Fertilitatis*, v.13, p.133-167, 1982.
- DEANA, R.; RIGONI, F.; FRANCESCONI, M.; CAVALLINI, L.; ARSLAN, P.; SILIPRANDI, N. Effect of L-carnitine and L-aminocarnitine on calcium transport, motility and enzyme release from ejaculated bovine spermatozoa. *Biology of Reproduction*, v.41, p.949-955, 1989.
- DEICHSEL, K.; PALM, F.; KOBLSCHKE, P.; BUDIK, S.; AURICH, C. Effect of a dietary antioxidant supplementation on semen quality in pony stallions. *Theriogenology*, v.69, p.940-945, 2008.

DHARTI, T.S.; GANDHI, S.; SHAH, M. Nutraceuticals - Portmanteau of science and nature. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, vol.5, p.33-38, 2010.

DROKIN, S.I.; VAISBERG, T.N.; KOPEIKA, E.F.; MITEVA, K.D.; PIRONCHEVA, G.L. Effect of cryopreservation on lipids and some physiological features of spermatozoa from rams pastured in highlands and in valleys. *Cytobios*, v.100, p.27-36, 1999.

DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v.39, n.4, p.343-350, 2003.

FAO. Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura. 2013. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#ancor>> acesso em: 28/07/15.

FORD, W.; WHITTINGTON, K. Debate: Is antioxidant therapy a promising strategy to improve human reproduction? Antioxidant treatment for male subfertility: a promise that remains unfulfilled. *Human Reproduction*, v.13, p.1416-1419, 1998.

GARMSIR, A.K.; SHAHNEH, A.Z.; JALALI, S.M.A.; NOURI, H.; AFSHAR, M. Effects of dietary Thyme (*Thymus vulgaris*) and fish oil on semen quality of miniature Caspian horse. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.34, p.1069-1075, 2014.

GLIOZZI, T.M.; ZANIBONI, L.; MALDJIAN, A.; LUZI, F.; MAERTENS, L.; CEROLINI, S. Quality and lipid composition of spermatozoa in rabbit fed DHA and vitamin E rich diets. *Theriogenology*, v.71, p.910-919, 2009.

GOMES, G.M.; GOMES, L.P.M. Problemas e soluções com o uso de sêmen congelado e refrigerado de garanhões da raça Mangalarga Marchador, *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, n.6, p.210-215, 2009.

GRADY, S.T.; CAVINDER, C.A.; BRINSKO, S.P.; FORREST, D.W.; SAWYER, J.E.; SCOTT, B.D. Dietary supplementation of two varyng sources of n-3 fatty acids and subsequeute effects on fresh, cooled and frozen seminal characteristics of stallions. *The Professional Animal Scientist*, v.25, p.768-773, 2009.

GRECO, E.; IACOBELLI, M.; RIENZI, L.; UBALDI, F, FERRERO, S. TESARIK, J. Reduction of the incidence of sperm DNA fragmentation by oral antioxidante treatment. *Journal of Andrology*, v.26, p.349-353, 2005.

HAFEMAN, D.G.; SUNDE, R.A.; HOEKSTRA, W.G. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutatione peroxidase in the rat. *Journal of Nutrition*, v.104, p.580-587, 1974.

HINTON, B.; SNOSWELL, A.; STECHELL, B. The concentration of carnitine in the luminal fluid of the testis and epididymis of the rat and some other mammals. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.56, p.105-111, 1979.

HOLT, L. E.; ALBANESE, A. A. Observations on amino acid deficiencies in man. *Transactions of the Association of American Physicians*, v.58, p.143-156, 1944.

HULSE, J. D.; ELLIS, S. R.; HENDERSON, L. M. Carnitine biosynthesis. Beta-hydroxylation of trimethyllysine by an alpha-ketoglutarate-dependent mitochondrial dioxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, v.253, p.1654-1659, 1978.

IMAI, H.; NAKAGAWA, Y. Biological significance of phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx 4) in mammalian cells. *Free Radical Biology & Medicine*, v.34, n.2, p.145-169, 2003.

JENKINS, D.; GRIFFITH, O. Antiketogenic and hypoglycemic effects of aminocarnitine and acylaminocarnitine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.83, p.290-294, 1986.

JEULIN, C.; DACHEUX, J. L.; SOUFIR, J. C. Uptake and release of free L-carnitine by boar epididymal spermatozoa in vitro and subsequent acetylation rate. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.100, p.263-271, 1994.

JEULIN, C.; LEWIN L.M. Role of free L-carnitine and acetyl-L-carnitine in post-gonadal maturation of mammalian spermatozoa. *Human Reproduction Update*, v.2, p. 87-102, 1996.

JONES, R.; MANN, T. Lipid peroxidation in spermatozoa. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, v.184, p.103-107, 1973.

KAMAL-ELDIN, A.; APPELGVIST, L. A. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, v.31, p.671-701, 1996.

KAO, S. H.; CHAO, H. T.; CHEN, H. W.; HWANG, T. I. S.; LIAO, T. L.; WEI, Y. H. Increase in oxidative stress in human sperm with lower motility. *Fertility and Sterility*, v.89, p.1183-1190, 2008.

KEFER, J. C.; AGARWAL, A.; SABANEKH, E. Role of antioxidants in the treatment of male infertility. *International Journal of Urology*, v.16, p.449-457, 2009.

KELSO, K.A.; REDPATH, A.; NOBLE, R.C.; SPEAKE, B.K. Lipid and antioxidant changes in spermatozoa and seminal plasma throughout the reproductive period of bulls. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.109, p.1-6, 1997.

KNOWLES, R.G.; PALACIOS, M.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.86, n.13, p.5159-5162, 1989.

KO, E. Y.; SABANEKH, E. S. The Role of Nutraceuticals in Male Fertility. *Urologic Clinics of North America*, v. 41, p. 181-193, 2014.

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

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

LAMIRANDE, E.; LAMOTHE, G. Reactive oxygen-induced reactive oxygen formation during human sperm capacitation. *Free Radical Biology and Medicine*, v.46, p.502-510, 2009.

LENZI, A.; SGRÒ, P.; SALACONE, P.; PAOLI, D.; GILIO, B.; LOMBARDO, F.; SANTULLI, M.; AGARWAL, A.; GANDINI, L. A placebo-controlled double-blind randomized trial of the use of combined L-carnitine and L-acetyl-carnitine treatment in men with asthenozoospermia. *Fertility and Sterility*, v.81, n.6, p.1578-1584, 2004.

MAIORINO, M.; BOSELLO, V.; URSINI, F.; FORESTA, C.; GAROLLA, A.; SACAPIN, M.; SZTAIER, H.; FLOHE, L. Genetic variations of gpx-4 and male infertility in human. *Biology of Reproduction*, v.68, p.1134-1141, 2003.

MASON, K. E. Differences in testis injury and repair after vitamin A-deficiency. Vitamin E-deficiency and inanition. *American Journal of Anatomy*, v.52, p.153-239, 1933.

MATALLIOTAKIS, I.; YOUMANTAKI, Y.; EVANGELIOU, A.; MATALLIOTAKIS, G.; GOUMENOU, A.; KOUMANTAKIS E. L-carnitine levels in the seminal plasma of fertile and infertile men: correlation with semen quality. *International Journal of Fertility*, v.45, p.236-240, 2000.

MCCANN, S.M.; MASTRONARDI, C.; WALCZEWSKA, A.; KARANTH, S.; RETTORI, V.; YU, W.H. The role of nitric oxide in reproduction. *Brazilian journal of medical and biological research*, v.32, p.1367-1379, 1999.

MENCHINI-FABRIS, G.F.; CANALE, D.; IZZO, P.L.; OLIVIERI, L.; BARTELLONI, M. Free L-carnitine in human semen: its variability in different andrologic pathologies. *Fertility and Sterility*, v.42, p.263-267, 1984.

MENDIOLA, J.; TORRES-CANTERO, A. M.; VIOQUE, J.; MORENO-GRAU, J. M.; TEN, J.; ROCA, M.; MORENO-GRAU, S.; BERNABEU, R. A low intake of antioxidant nutrients is associated with poor semen quality in patients attending fertility clinics. *Fertility and Sterility*, v.93, p.1128-1133, 2010.

MIROUEH, A. Effect of arginine on oligospermia. *Fertility and Sterility*, v.21, p.217-129, 1970.

NOACK-FULLER, G.; De BEER, C.; SEIBERT, H. Cadmium, lead, selenium, and zinc in semen of occupationally unexposed men. *Andrologia*, v.25, p.7-12, 1993.

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

O'BRYAN, M. K.; ZINI, A.; CHENG, C.Y.; SCHLEGEL, P. N. Human sperm endothelial nitric oxide synthase expression: correlation with sperm motility. *Fertility and Sterility*, v.70, p.1143-1147, 1998.

OIE. Organização Mundial de Saúde Animal. 2014. Disponível em: <[http://www.oie.int/wahis\\_2/public/wahid.php/Countryinformation/Animalpopulation](http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Countryinformation/Animalpopulation)> acesso em: 28/07/2015.

PALAMANDRA, J. R.; KEHRER, J. R. Involvement of vitamin E and protein thiols in the inhibition of microsomal lipid peroxidation by glutathione. *Lipids*, v.23, p.427-443, 1993.

PALMERO, S.; BOTTAZI, C.; COSTA, M.; LEONE, M.; FUGASSA, E. Metabolic effects of L-carnitine on prepubertal rat Sertoli cells. *Hormone and Metabolic Research*, v.32, p.87-90, 2000.

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, v.38, p.209-222. 1992.

PENA, F.J.; GARCIA, B.M.; SAMPER, J.C.; APARICIO, I.M.; TAPIA, J.A.; FERRUSOLA, C.O. Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: the way to improve current cryopreservation protocols? *Theriogenology*, v.76, p.1177-1186, 2011.

PRYOR, J. P.; BLANDY, J.P.; EVANS, P.; CHAPUT DE SAINTONGE, D. M.; USHERWOOD, M. Controlled clinical trial of arginine for infertile men with oligozoospermia. *British Journal of Urology*, v.50, p. 47-50, 1978.

REICHENBACH, H.D.; MORAES, J.C.F.; NEVES, J.P. Tecnologia de sêmen e inseminação artificial em bovinos. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. (Eds.) Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 2.ed. São Paulo, Roca: 2008. p.57-82.

REYNOLDS, E. Vitamin B12, folic acid, and the nervous system. *The Lancet Neurology*, v.5, p. 949-960, 2006.

RILLO, M. R.; Reproduccion e inseminacion artificial porcina. Espanha: Ed Aedos, 1982, p.54-73.

RUFO, G.J.; SCHOFF, P.; LARDY, H. Regulation of calcium content in bovine spermatozoa. *Journal of Boilological Chemistry*, v.259, p.2547-2552, 1984.

RYAN, T. C.; WEIL, G. J.; NEWBURGER, P. E.; HAUGLAND, R.; SIMONS, E. R. Measurement of superoxide release in the phagocytosomes of immune complex-stimulated human neutrophils. *Journal of Immunological Methods*, v.130, p.223-233, 1990.

SAFARINEJAD, M. R.; SAFARINEJAD, S. Efficacy of selenium and/or N-acetyl-cysteine for improving semen parameters in infertile men: a double-blind, placebo controlled, randomized study. *Journal of Urology*, v.181, p.741-751, 2009.

SALEM, M.H.; KAMEL, K.I.; YOUSEF, M.I.; HASSAN, G. A.; EL-NOUTY, F. D. Protective role of ascorbic acid to enhance semen quality of rabbits treated with sublethal doses of aflatoxin B<sub>1</sub>. *Toxicology*, v.162, p.209-218, 2001.

SCHACHTER, A.; GOLDMAN, J. A.; ZUKERMAN, Z. Treatment of oligospermia with the amino acid arginine. *Journal of Urology*, v.110, p. 311-313, 1973.

SCHIBONA, M.; MSESCHINI, P.; CAPPARELLI, S.; PECORI, C.; ROSSI, P.; MENCHINI-FABRIS, G. F. L-Arginine and male infertility. *Minerva Urologica e Nefrologica*, v.46, n.4, p. 251-253, 1994.

SCHMID-LAUSIGK, Y.; AURICH, C. Influences of a diet supplemented with linseed oil and antioxidants on quality of equine semen after cooling and cryopreservation during winter. *Theriogenology*, v.81, p.966-973, 2014.

SCOTT, J.W. Lipid metabolism of spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.18, suppl., p.65-76, 1999.

SOLOMON, L. R. Disorders of cobalamin (Vitamin B12) metabolism: Emerging concepts in pathophysiology, diagnosis and treatment. *Blood Reviews*, v. 21, p. 113-130, 2007.

SONMEZ, M.; TURK, G.; YUCE, A. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. *Theriogenology*, v.63, n.7, p.2063-2072, 2005.

SRIVASTAVA, S.; AGARWAL, A. Effect of anion channel blockers on L-arginine action in spermatozoa from asthenospermic men. *Andrologia*, v.42, n.2, p. 76-82, 2010.

STRADAIOLI, G.; SYLLA, L.; ZELLI, R.; SUPPLIZI, A.V.; CHIODI, P.; ARDUINI, A.; MONACI, M. Seminal carnitine and acetylcarnitine content and carnitine acetyltransferase activity in young Maremmano stallions. *Animal Reproduction Science*, v.64, p.233-245, 2000.

STRADAIOLI, G.; SYLLA, L.; ZELLI, R.; CHIODI, P.; MONACI, M. Effect of L-carnitine administration on the seminal characteristics of oligoasthenospermic stallions. *Theriogenology*, v.62, p.761-777, 2004.

SURAI, P.F.; BRILLARD, J.P.; SPEAKE, B.K.; BLESBOIS, E.; SEIGNEURIN, F.; SPARKS, N.H. Phospholipids fatty acid composition, vitamin E content and susceptibility to lipid peroxidation of duck spermatozoa. *Theriogenology*, v.53, p.1025-1039, 2000.

TANIMURA, J. Studies on arginine in human semen. Part II. The effects of medication with L-arginine- HCl on male infertility. *Bulletin of the Osaka Medical School*, v.13, p.84-89, 1967.

THIELE, J.J.; FREISLEBEN, H.J.; FUCHS, J.; OCHSENDORF, F. R. Ascorbic acid and urate in human seminal plasma: determination and interrelationships with chemiluminescence in washed semen. *Human Reproduction*, v.10, p.110-155, 1995.

URSINI, F.; HEIM, S.; KIESS, M.; MAIORINO, M.; ROVERI, A.; WISSING, J.; FLOHÉ, L. Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science*, v.285, p.1393-1396, 1999.

VEZINA, D.; MAUFFETTE, F.; ROBERTS, K.D.; BLEAU, G. Selenium- vitamin E supplementation in infertile men. Effects on semen parameters and micronutrient levels and distribution. *Biological Trace Element Research*, v.53, p.65-83, 1996.

VICARI, E.; CALOGERO, A. Effects of treatment with carnitines in infertile patients with prostate-vesiculo-epididymitis. *Human Reproduction*, v.16, p.2338-2342, 2001.

VICARI, E.; LaVIGNERA, S.; CALOGERO, A. Antioxidant treatment with carnitines is effective in infertile patients with prostatovesiculoeepididymitis and elevated seminal leukocyte concentrations after treatment with nonsteroidal anti-inflammatory compounds. *Fertility and Sterility*, v.6, p.1203-1208, 2002.

VIRGINI, A.; ALIDORI, A.; MONTESI, L.; RAFFAELLI, F.; NANETTI, L.; BERTOLI, E.; MAZZANTI, L. Vitamin E, diabetes and related diseases: na update. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, v.4, p.3-9, 2011.

YESTE, M.; BARRERA, X.; COLL, D.; BONET, S. The effects on boar sperm quality of dietary supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acids differ among porcine breeds. *Theriogenology*, v.76, p.184-196, 2011.

YEUNG, C.; COOPER, T.; WAITES, G. Carnitine transport into the perfused epididymis of the rat: regional differences, stereospecificity, stimulation by choline, and the effect of other luminal factors. *Biology of Reproduction*, v.23, p.294-304, 1980.

YOUNG, S. S.; ESKENAZI, B.; MARCHETTI, F. M.; BLOCK, G.; WYROBEK, A. J. The association of folate, zinc, and antioxidant intake with sperm aneuploidy in healthy non-smoking men. *Human Reproduction*, v.23, p.1014-1022, 2008.

WATANABLE, T.; ENDO, A. Effects of selenium deficiency on sperm morphology and spermatocyte chromosomes in mice. *Mutation Research*, v.262, p.93-99, 1991.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v.60-61, p.481-492, 2000.

WOLBACH, S. B.; HOWE, P.R. Tissues changes following deprivation of fat-soluble A vitamin. *Journal of Experimental Medicine*, v.42, p.753-777, 1925.

ZEISEL, S.H. Regulation of 'nutraceuticals'. *Science*, v.285, p.1853-1855, 1999.

ZÖPFGEN, A.; PRIEM, F.; SUDHOFF, F.; JUNG, K.; LENK, S.; LOENING, S. A.; SINHA, P. Relationship between semen quality and the seminal plasma componentes carnitine, alpha-glucosidase, fructose, citrate and granulocyte elastase in infertile men compared with a normal population. *Human Reproduction*, v.15, p.840-845, 2000.

## **CAPÍTULO II**

## 1 RESUMO

### **QUALIDADE DO SÊMEN FRESCO, REFRIGERADO E CRIOPRESERVADO EM GARANHÕES SUPLEMENTADOS COM PRODUTO COMERCIAL COMPOSTO POR AMINOÁCIDOS, VITAMINAS, ANTIOXIDANTES E MINERAIS**

Objetivou-se com esse estudo avaliar a suplementação de garanhões com um produto comercial fornecido via oral, contendo antioxidantes, ômega 3 e 6, L-carnitina, vitaminas do complexo B, entre outros, na dieta de garanhões, e a sua influência nos parâmetros do sêmen fresco, refrigerado e criopreservado dos animais. Sete garanhões, com histórico reprodutivo conhecido, foram divididos em dois grupos de forma balanceada, levando em consideração a qualidade do sêmen fresco, previamente avaliada. O grupo tratamento (n=3) recebeu 50 mL do produto comercial por 60 dias consecutivos, e o grupo controle (n=4) recebeu 50 mL de solução placebo, no mesmo período. Ao término dos 60 dias de suplementação, foram realizadas três colheitas de sêmen de cada garanhão, em dias alternados, para a avaliação do sêmen fresco, refrigerado e congelado. Avaliou-se a motilidade e a cinética espermática através das variáveis obtidas pela análise espermática computadorizada e a integridade de membrana plasmática e acrossomal através de sondas fluorescentes. Nos animais que receberam o tratamento, observou-se que o sêmen fresco apresentou um aumento ( $P < 0.05$ ) da motilidade total (MT;  $67,14 \pm 5,24 \times 72,28 \pm 8,13 \%$ ), da motilidade progressiva (MP;  $16,67 \pm 8,69 \times 22,49 \pm 8,81\%$ ), da velocidade de

trajeto (VAP;  $50,21 \pm 5,30 \mu\text{m/s}$ ), da espermatozoides com membrana íntegra (MI;  $72,31 \pm 6,65 \times 79,27 \pm 5,30 \%$ ) e de espermatozoides com membrana acrossomal íntegra (ISRA;  $68,67 \pm 5,79 \times 74,67 \pm 6,88 \%$ ). No sêmen refrigerado obteve-se um aumento ( $P < 0,05$ ) da MT, da VAP, da MI e da ISRA em todos os momentos avaliados (24h, 36h e 48h), nos animais que receberam o produto comercial. Na avaliação do sêmen criopreservado, observou-se um aumento ( $P < 0,05$ ) da MT ( $33,02 \pm 10,88 \times 47,50 \pm 10,61 \%$ ), da MP ( $3,77 \pm 2,75 \times 9,77 \pm 4,54 \%$ ), da VAP ( $39,29 \pm 3,24 \times 44,87 \pm 1,49 \mu\text{m/s}$ ) e da velocidade retilínea (VSL;  $31,94 \pm 2,02 \times 35,74 \pm 1,46 \mu\text{m/s}$ ), nos animais que receberam o tratamento. Dessa forma, os elementos presentes no produto comercial fornecido para os animais do grupo tratamento, podem ter atuado incrementando a qualidade do sêmen fresco, refrigerado e criopreservado dos garanhões.

Palavras-chave: espermatogênese, fertilidade, inseminação artificial, nutrição, sêmen

## 2 ABSTRACT

### **QUALITY OF FRESH, COOLED AND FROZEN-THAWED SEMEN OF STALLIONS SUPPLEMENTED WITH A COMERCIAL PRODUCT COMPOUND OF AMINO ACIDS, VITAMINS, ANTIOXIDANTS AND MINERALS**

The objective of this study was to evaluate the addition of a nutraceutical containing antioxidants, omega 3 and 6, L-carnitine, B-complex vitamins, among others, in the diet of stallions, and their influence on parameters of fresh, cooled and cryopreserved semen. Seven stallions with proven fertility were divided into two groups in a balanced way, taking into account the quality of fresh semen, previously evaluated. The treatment group (n = 3) received 50 mL of the nutraceutical for 60 consecutive days and the control group (n = 4) received 50 ml of placebo solution for the same period. By the end of the 60 days of supplementation, were realized three collections of semen of each stallion, on alternate days, for the assessment of fresh, cooled and cryopreserved semen. Motility and sperm motion kinetics using computerized assisted semen analysis and integrity of acrosome and plasmatic membrane using fluorescent dyes were evaluated. In animals that received treatment, it was observed that the fresh semen showed an improvement (P <0.05) in total motility (MT;  $67.14 \pm 5.24$  x  $72.28 \pm 8.13$  %), of the progressive motility (MP;  $16.67 \pm 8.69$  x  $22.49 \pm 8.81$  %), the average path velocity (VAP;  $50.21 \pm 5.30$   $\mu\text{m/s}$ ), and the integrity of the plasmatic (MI;  $72.31 \pm 6.65$  x  $79.27 \pm 5.30$  %) and acrosome membranes (ISRA;  $68.67 \pm 5.79$  x  $74.67 \pm 6.88$  %). In cooled semen was obtained an increase (P <0.05) of the MT, the VAP, MI and ISRA in all moments of the evaluation (24h, 36h and 48h), in animals that received the commercial product. After the evaluation of cryopreserved semen, there was an increase (P <0.05) of MT ( $33.02 \pm 10.88$  x  $47, 50 \pm 10.61$  %), MP ( $3.77 \pm 2.75$  x  $9, 77 \pm 4.54$  %), VAP ( $39.29 \pm 3.24$  x  $44.87 \pm 1.49$   $\mu\text{m/s}$ ), and straight line

velocity (VSL;  $31.94 \pm 2.02 \times 35.74 \pm 1.46 \mu\text{m/s}$ ), in animals receiving treatment. Thus, the elements present in the commercial product supplied for the animals on the treatment group, may have acted improving the quality of fresh semen, cooled and cryopreserved of the stallions.

**Keywords:** artificial insemination, fertility, nutrition, semen, spermatogenesis

### 3 INTRODUÇÃO

A técnica de reprodução assistida mais comum no mundo, aplicada na indústria equina é a inseminação artificial, seja com sêmen fresco, refrigerado ou congelado. Um sêmen de boa qualidade é um dos fatores mais importantes para obtermos sucesso em programas de melhoramento genético em equinos (Magistrini et al., 1996; Parlevliet & Colenbrander, 1999; Stradaoli et al., 2004).

Está estabelecido que fatores ambientais podem alterar a secreção hormonal, a diferenciação celular nos testículos, além da maturação e o transporte dos espermatozoides no epidídimo. Diante de fatores adversos, os testículos podem apresentar degeneração e distúrbios em diferentes graus e intensidades, temporários ou permanentes, assim, determinando uma maior ou menor influência na fertilidade do animal (Arruda et al., 2010).

A indústria tem disponibilizado no mercado uma série de substâncias com a intenção de otimizar a utilização de nutrientes em algumas vias metabólicas, influenciando positivamente o desempenho reprodutivo dos animais (Arruda et al., 2010). O ômega 3 e o ômega 6 são ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs), essenciais para a manutenção da estrutura, função e integridade de membrana plasmática dos espermatozoides, e devem ser adicionados à dieta dos animais, já que eles não possuem a capacidade de sintetizar os PUFAs a partir de ácidos graxos saturados ou monoinsaturados (Colenbrander et al., 1999; Brinsko et al., 2005).

Por possuir uma elevada concentração de PUFAs, a membrana plasmática dos espermatozoides é altamente suscetível à ação das espécies reativas ao oxigênio (EROs) e à peroxidação lipídica (Jones & Mann, 1973; Aitken et al., 1993). Dessa forma, a atuação dos antioxidantes é fundamental para impedir danos à membrana plasmática e ao DNA dos espermatozoides, que levam à diminuição da motilidade espermática (Ryan et al., 1990; Kao et al., 2008). Por isso, é recomendada a associação da suplementação de ômega 3 e 6, juntamente com antioxidantes (Gliozzi et al., 2009).

A L-carnitina é outro nutracêutico, que desempenha um papel vital no metabolismo energético celular, atuando como transportador de ácidos graxos para dentro da membrana mitocondrial interna, facilitando a  $\beta$ -oxidação (Hulse et al., 1978; Jeulin et al., 1994). Sendo assim, a carnitina fornece energia e atua na motilidade e maturação dos espermatozoides (Palmero et al., 2000).

Alguns trabalhos vem sendo realizados com a implementação de produtos comerciais na dieta de garanhões, com a finalidade de melhorar seus parâmetros espermáticos e a qualidade do sêmen armazenado (Stradaioli et al., 2000; Stradaioli et al., 2004; Brinsko et al., 2005; Deichsel et al., 2008; Contri et al., 2011; Garmsir et al, 2014; Schmid-Lausigk & Aurich, 2014). Porém, a maioria desses trabalhos avaliou apenas uma ou a associação de duas substâncias que atuam como nutracêuticos.

Dessa forma, o objetivou-se com esse estudo avaliar se um produto comercial, contendo várias substâncias nutracêuticas, melhora o comportamento sexual dos animais e a qualidade do sêmen fresco, refrigerado e criopreservado de garanhões.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Foram utilizados sete garanhões da raça Mangalarga Marchador, cujas idades variaram entre três e doze anos, e pesavam entre 345 e 430 kg. Os garanhões tiveram a qualidade do sêmen previamente avaliada, e todos apresentaram parâmetros seminais de acordo com o preconizado pelo CBRA (2013) para o sêmen fresco. Os animais estavam em uma mesma propriedade em Brasília/DF, na região central do Brasil (15°.32' S, 47°.51' O), alojados em cocheiras de 20 metros quadrados, sendo fornecido *ad libitum*: água, capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, Schumach, cultivar Napier) e suplementação mineral para equinos (Bellforte, Bellman Nutrição Animal, Cuiabá/MT). Além de 4 kg por dia de ração concentrada (Nutrina Equinos Premium 150, Nutrina, Brasília/ DF; composição nutricional: 15% de proteína bruta, 2% de extrato etéreo, 10% de matéria fibrosa, 13% de matéria mineral, 1,5% de cálcio, 0,5% de fósforo). O Experimento teve início no mês de novembro de 2013 e foi concluído no mês de janeiro de 2014. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, sob o protocolo UnBDoc Nº 12701/2014.

### 4.2 Delineamento experimental

Após exame andrológico, os animais foram divididos em dois grupos de forma balanceada de acordo com a idade e qualidade do sêmen fresco (volume do ejaculado,

concentração espermática, motilidade total e morfologia), sendo denominados de Grupo Tratamento (n=3) e Grupo Controle (n=4).

O Grupo Tratamento recebeu suplementação oral diária com 50mL do nutracêutico comercial (Tabela 2.1) por 60 dias consecutivos, enquanto o Grupo Controle recebeu administração oral de 50mL de solução placebo (solução salina) no mesmo período.

Tabela 2.1 – Níveis de garantia do nutracêutico Reproductive<sup>®</sup> Garanhões JCR (VETNIL, Louveira/SP), mínimo por Kg.

Vitamina A	800.850UI
Vitamina B12	17.292mcg
Vitamina B6	720mg
Vitamina E	22.000UI
Ácido Fólico	1.326mg
Betacaroteno	500mg
L-Carnitina	330,005g
Glutamina	1.500mg
Ácido Aspártico	280mg
Ácido Glutâmico	2800mg
Arginina	28,41g
Fenilalanina	370mg
Glicina	4.600mg
Lisina	740mg
Ômega 3	110g
Ômega 6	55g
Ácido Oléico	57,072g
Prolina	2.330mg
Taurina	1.500mg
Valina	460mg
Selênio	150mg
Zinco	3.303mg
Cobre	574mg
Cromo	221mg

Duas semanas antes do término dos 60 dias de tratamento, os animais passaram por esgotamento das reservas espermáticas extragonadais, que foi realizada através de uma colheita de sêmen em dias alternados no período de uma semana. Na última semana de suplementação os animais tiveram descanso das colheitas. Ao término dos 60 dias de suplementação, deu-se início às colheitas de sêmen para avaliação da libido e da qualidade do sêmen fresco, refrigerado e criopreservado. Foram realizadas três colheitas, em dias alternados, de cada um dos sete garanhões, resultando em um total de vinte e um ejaculados.

### 4.3 Colheita e processamento do sêmen

As colheitas foram realizadas utilizando vagina artificial modelo Botucatu com filtro de náilon acoplado ao copo coletor, obtendo-se um ejaculado livre da fração gel. Foi utilizado um manequim artificial, com a presença de uma égua em estro ao lado do manequim, para estimulação dos garanhões.

Após a colheita e a filtração do sêmen, foi verificado o volume (mL), aspecto (densidade e cor), a concentração espermática, cinética espermática computadorizada, integridade de membrana plasmática e acrossomal e avaliação da morfologia espermática por meio da técnica de contraste de fase em câmara úmida segundo as normas do CBRA (2013).

Imediatamente após a avaliação inicial, metade do ejaculado foi diluída a uma concentração de  $50 \times 10^6$  de espermatozoides/mL com meio a base de leite em pó desnatado, glicose, bicarbonato de sódio e amicacina (Botusêmen, Biotech Botucatu, Botucatu/SP) e destinada à refrigeração a 5°C por até 48h.

O sêmen refrigerado foi colocado em tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, completamente preenchidos com sêmen. Os tubos de microcentrífuga foram dispostos em caixas de transporte do modelo BotuFlex (Biotech Botucatu, Botucatu/SP), conforme indica o fabricante. Foi utilizada uma caixa de transporte para cada momento da avaliação do sêmen refrigerado (24h, 36h e 48h).

A outra metade do ejaculado foi diluída na proporção 1:1 com o mesmo diluente utilizado para a refrigeração, e foi destinado à criopreservação. Para isso, foi realizada a centrifugação a  $600 \times g$  por 10 minutos, para retirada do plasma seminal e concentração dos espermatozoides. O sedimento de espermatozoides (*pellet*) foi ressuscitado com diluente de criopreservação (Botucurio<sup>®</sup>, Biotech Botucatu, Botucatu/ SP), e a concentração foi ajustada para  $100 \times 10^6$  de espermatozoides/mL, o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5mL, lacradas e identificadas de acordo com o tratamento. Em seguida, as palhetas passaram por um período de 20 minutos de estabilização à 5°C em refrigerador comercial. Logo após, foram colocadas no vapor de nitrogênio, a uma distância de 6 cm do nitrogênio líquido, onde permaneceram por mais 20 minutos, em uma caixa de isopor de 20 litros. Ao término desse procedimento, as palhetas foram imersas no nitrogênio líquido, acondicionadas em raques previamente identificadas, e organizadas em canecas no botijão criogênico.

Para as avaliações pós-descongelamento, o sêmen foi descongelado a uma temperatura de 37°C por 30 segundos.

#### **4.4 Avaliação do sêmen (fresco, refrigerado e criopreservado)**

Foram realizadas avaliações da cinética espermática e da integridade de membrana plasmática e acrossomal, tanto para o sêmen fresco, como para o sêmen refrigerado e criopreservado. As avaliações para o sêmen refrigerado foram conduzidas nos seguintes momentos: 24h, 36h e 48h de acondicionamento, simulando o tempo de transporte necessário para chegar até as propriedades.

A cinética espermática foi avaliada pelo sistema automatizado CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*), onde 10 µL de sêmen foram colocados na lâmina de leitura (*Makler<sup>®</sup> counting chamber, Selfi-medical instruments*, Califórnia, EUA), sendo a amostra avaliada no aparelho modelo Ivos-Ultimate 12 da *Hamilton Thorne Biosciences*, previamente ajustado (SETUP equino). Os parâmetros do sistema para a avaliação computadorizada do sêmen foram: 45 quadros adquiridos à 60 quadros/s; contraste mínimo 70; tamanho mínimo de célula 4 pixels; corte da velocidade de trajeto de 20µm/s; corte da velocidade de trajeto para células progressivas de 50 µm/s e retilinearidade de 60%; corte da velocidade retilínea de 0µm/s. As células lentas foram consideradas estáticas. Três campos aleatórios foram selecionados para leitura e análise. As variáveis avaliadas foram: Motilidade total (%; MT), Motilidade progressiva (%; MP), Velocidade de trajeto (µm/s; VAP) e Velocidade retilínea (µm/s; VSL).

Para avaliação da integridade de membrana plasmática, foram utilizadas sondas fluorescentes como iodeto de propídeo (IP) e diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) através da técnica de Harrison & Vickers (1990), com microscopia de epifluorescência.

Para integridade da membrana acrossomal foi utilizada a sonda fluorescente isotiocionato de fluoresceína conjugado com aglutinina de amendoim (*Arachis hypogea*; FITC-PNA) e iodeto de propídeo (IP), como descrito por Klinc e Rath (2007). Para as duas técnicas de fluorescência foram avaliadas 200 células em microscopia de fluorescência de contraste de fase no aumento de 1000x.

#### **4.5 Análise Estatística**

O delineamento experimental foi realizado em arranjo fatorial dois por dois. As informações obtidas no trabalho de campo foram editadas em planilhas eletrônicas, usando-se os procedimentos disponíveis no pacote computacional Microsoft Office 2007 e trabalhadas de modo a se obter um conjunto de dados estruturados que permitisse o início das análises preliminares.

Foi realizada as análises estatísticas básicas (frequências, medidas de dispersão em relação à média e tipo de distribuição) utilizando-se o procedimento UNIVARIATE do Statistical Analysis System (SAS) como descrito por Littell et al. (2002). As análises de crítica e consistência dos dados foram realizadas com a utilização do programa computacional SAEG (2005), empregaram-se os testes: Lilliefors, para determinar se os erros experimentais das variáveis possuíam distribuição normal de probabilidades, e o de Bartlett, para determinar se as variáveis possuíam homogeneidade de variância dos erros experimentais.

Como as variáveis estudadas não apresentaram distribuição normal de probabilidade (mesmo após transformações radiciais e angulares), desobedecendo assim a premissa básica da análise de variância, optou-se pela análise não paramétrica utilizando-se o teste H de Kruskal-Wallis através do procedimento NPAR1WAY do pacote computacional Statistical Analysis System (SAS) como descrito por Littell et al. (2002).

## 5 RESULTADOS

Na avaliação do sêmen fresco, não foi observada diferença estatística ( $P > 0,05$ ) entre o grupo Tratamento e Controle para volume do ejaculado, concentração espermática e total de células morfológicamente normais, onde todos os ejaculados apresentaram mais de 65% de células sem defeitos. Em relação ao aspecto do ejaculado, em todas as colheitas, o sêmen estava de acordo com o padronizado para equinos pelo CBRA (2013): coloração âmbar ou gris e a densidade aquosa à leitosa.

As variáveis de cinética espermática e de integridade de membrana plasmática e acrossomal do sêmen fresco estão descritas nas Tabelas 2.2 e 2.3, respectivamente. Os valores de motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade de trajeto (VAP), integridade de membrana plasmática (MI) e integridade de membrana acrossomal (ISRA) foram superiores no grupo tratamento ( $P < 0,05$ ), quando comparados ao grupo controle.

Tabela 2.2: Resultados da avaliação da cinética espermática computadorizada (CASA) do sêmen fresco de garanhões da raça Mangalarga Marchador após suplementação oral por 60 dias com solução salina (Grupo Controle -  $n=4$ ) e nutracêutico reprodutivo (Grupo Tratamento -  $n=3$ ), com relação a: Motilidade total (%; MT), Motilidade progressiva (%; MP), Velocidade de trajeto ( $\mu\text{m/s}$ ; VAP) e velocidade retilínea ( $\mu\text{m/s}$ ; VSL)

	MT	MP	VAP	VSL
Controle	67,14 $\pm$ 5,24 <sup>a</sup>	16,67 $\pm$ 8,69 <sup>a</sup>	50,21 $\pm$ 5,30 <sup>a</sup>	35,65 $\pm$ 4,74
Tratamento	72,28 $\pm$ 8,13 <sup>b</sup>	22,49 $\pm$ 8,81 <sup>b</sup>	59,24 $\pm$ 3,82 <sup>b</sup>	34,59 $\pm$ 4,85

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença ( $P < 0,05$ )

Tabela 2.3: Resultados da avaliação da integridade de membrana plasmática e da integridade de membrana acrossomal, do sêmen fresco de garanhões da raça Mangalarga Marchador após suplementação oral por 60 dias com solução salina (Grupo Controle -  $n=4$ ) e nutracêutico reprodutivo (Grupo Tratamento -  $n=3$ ), com relação à:

Membrana plasmática íntegra (%; MI), Membrana plasmática íntegra sem reação acrossomal (%; ISRA), Membrana plasmática íntegra sem reação acrossomal (%; ICRA) Membrana plasmática lesada sem reação acrossomal (%; LSRA) e Membrana plasmática lesada com reação acrossomal (%; LCRA)

	MI	ISRA	ICRA	LSRA	LCRA
Controle	72,31 ± 6,65 <sup>a</sup>	68,67 ± 5,79 <sup>a</sup>	0,37 ± 0,34 <sup>a</sup>	26,18 ± 4,95	4,35 ± 1,90
Tratamento	79,27 ± 5,30 <sup>b</sup>	74,67 ± 6,88 <sup>b</sup>	0,00 ± 0,00 <sup>b</sup>	23,69 ± 6,82	4,80 ± 3,00

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística (P < 0,05)

Na avaliação do sêmen refrigerado (Tabelas 2.4 e 2.5), a MT e a VAP foram superiores (P<0,05) nos animais que receberam o tratamento, o que também ocorreu com a MP após 24h e 36h de refrigeração e com a VSL após o sêmen ser refrigerado por 24h. A MI e a ISRA também apresentaram valores superiores (P<0,05), para o grupo tratamento, em relação ao grupo controle em todos os momentos da avaliação do sêmen refrigerado.

Tabela 2.4: Resultados da avaliação da cinética espermática computadorizada (CASA) do sêmen refrigerado por 24h, 36h e 48h de garanhões da raça Mangalarga Marchador após suplementação oral por 60 dias com solução salina (Grupo Controle - n=4) e nutracêutico reprodutivo (Grupo Tratamento – n=3), com relação a: Motilidade total (%; MT), Motilidade progressiva (%; MP), Velocidade de trajeto (µm/s; VAP) e velocidade retilínea (µm/s; VSL)

	MT	MP	VAP	VSL
24h				
Controle	35,13 ± 12,39 <sup>a</sup>	3,84 ± 5,68 <sup>a</sup>	43,53 ± 5,90 <sup>a</sup>	25,10 ± 5,06 <sup>a</sup>
Tratamento	49,72 ± 9,16 <sup>b</sup>	6,54 ± 1,79 <sup>b</sup>	53,70 ± 2,92 <sup>b</sup>	27,52 ± 2,06 <sup>b</sup>
36h				
Controle	23,09 ± 8,68 <sup>a</sup>	1,25 ± 1,33 <sup>a</sup>	40,70 ± 5,43 <sup>a</sup>	22,83 ± 4,31
Tratamento	40,23 ± 7,87 <sup>b</sup>	2,74 ± 1,24 <sup>b</sup>	48,76 ± 4,82 <sup>b</sup>	22,88 ± 2,59
48h				
Controle	18,26 ± 6,98 <sup>a</sup>	1,33 ± 1,51	40,73 ± 7,19 <sup>a</sup>	22,61 ± 3,86
Tratamento	37,05 ± 8,34 <sup>b</sup>	1,80 ± 0,91	49,27 ± 5,64 <sup>b</sup>	22,85 ± 1,83

Letras diferentes na mesma coluna e no mesmo momento, indicam diferença estatística (P<0,05)

Tabela 2.5: Resultados da avaliação da integridade de membrana plasmática e da integridade de membrana acrossomal, do sêmen refrigerado por 24h, 36h e 48h de garanhões da raça Mangalarga Marchador após suplementação oral por 60 dias com solução salina (Grupo Controle - n=4) e nutracêutico reprodutivo (Grupo Tratamento – n=3), com relação à: Membrana plasmática íntegra (%; MI), Membrana plasmática íntegra sem reação acrossomal (%; ISRA), Membrana plasmática íntegra sem reação acrossomal (%; ICRA) Membrana plasmática lesada sem reação acrossomal (%; LSRA) e Membrana plasmática lesada com reação acrossomal (%; LCRA)

	MI	ISRA	ICRA	LSRA	LCRA
24h					
Controle	54,69 ± 11,28 <sup>a</sup>	54,10 ± 11,15 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,30	36,79 ± 7,65 <sup>a</sup>	11,25 ± 4,88
Tratamento	60,88 ± 5,87 <sup>b</sup>	60,27 ± 5,79 <sup>b</sup>	0,42 ± 0,69	26,82 ± 4,39 <sup>b</sup>	11,98 ± 4,41
36h					
Controle	42,36 ± 8,95 <sup>a</sup>	45,67 ± 8,06 <sup>a</sup>	0,59 ± 0,51	39,81 ± 6,02 <sup>a</sup>	15,74 ± 4,62
Tratamento	52,58 ± 7,40 <sup>b</sup>	54,29 ± 6,81 <sup>b</sup>	0,63 ± 0,44	29,88 ± 4,43 <sup>b</sup>	15,72 ± 3,93
48h					
Controle	34,26 ± 6,21 <sup>a</sup>	37,67 ± 6,37 <sup>a</sup>	0,52 ± 0,56	41,65 ± 6,72 <sup>a</sup>	22,26 ± 6,76 <sup>a</sup>
Tratamento	47,21 ± 7,27 <sup>b</sup>	49,08 ± 6,56 <sup>b</sup>	0,47 ± 0,34	33,93 ± 3,71 <sup>b</sup>	14,55 ± 3,90 <sup>b</sup>

Letras diferentes na mesma coluna e no mesmo momento indicam diferença estatística (P<0,05)

O sêmen criopreservado apresentou todos os parâmetros da cinética espermática avaliados, a MI e a ISRA superiores no grupo tratamento, comparado ao grupo controle (P<0,05).

Tabela 2.6: Resultados da avaliação da cinética espermática computadorizada (CASA) do sêmen criopreservado de garanhões da raça Mangalarga Marchador após suplementação oral por 60 dias com solução salina (Grupo Controle - n=4) e nutracêutico reprodutivo (Grupo Tratamento - n=3), com relação a: Motilidade total (%; MT), Motilidade progressiva (%; MP), Velocidade de trajeto (µm/s; VAP) e velocidade retilínea (µm/s; VSL)

	MT	MP	VAP	VSL
Controle	33,02 ± 10,88 <sup>a</sup>	3,77 ± 2,75 <sup>a</sup>	39,29 ± 3,24 <sup>a</sup>	31,94 ± 2,02 <sup>a</sup>
Tratamento	47,50 ± 10,61 <sup>b</sup>	9,77 ± 4,54 <sup>b</sup>	44,87 ± 1,49 <sup>b</sup>	35,74 ± 1,46 <sup>b</sup>

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença (P<0,05)

Tabela 2.7: Resultados da avaliação da integridade de membrana plasmática e da integridade de membrana acrossomal, do sêmen criopreservado de garanhões da raça Mangalarga Marchador após suplementação oral por 60 dias com solução salina (Grupo Controle - n=4) e nutracêutico reprodutivo (Grupo Tratamento - n=3), com relação à: Membrana plasmática íntegra (%; MI), Membrana plasmática íntegra sem reação acrossomal (%; ISRA), Membrana plasmática íntegra sem reação acrossomal (%; ICRA) Membrana plasmática lesada sem reação acrossomal (%; LSRA) e Membrana plasmática lesada com reação acrossomal (%; LCRA)

	MI	ISRA	ICRA	LSRA	LCRA
Controle	41,28 ± 5,20 <sup>a</sup>	34,92 ± 4,57 <sup>a</sup>	0,00 ± 0,00	43,90 ± 5,09 <sup>a</sup>	20,44 ± 6,62
Tratamento	48,66 ± 5,95 <sup>b</sup>	46,23 ± 6,03 <sup>b</sup>	0,00 ± 0,00	31,76 ± 3,94 <sup>b</sup>	22,75 ± 4,06

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística (P < 0,05)

## 6 DISCUSSÃO

Observou-se um aumento das motilidades total e progressiva, da velocidade de trajeto e da integridade das membranas plasmática e acrossomal, quando os animais receberam o nutracêutico reprodutivo por um período de 60 dias (Tabelas 2.2-2.7). Dessa forma, pode-se sugerir que o produto utilizado no experimento resultou em uma melhora da qualidade do sêmen fresco, refrigerado e criopreservado dos garanhões da raça Mangalarga Marchador, devido aos seus componentes essenciais para a espermatogênese, tais como vitaminas, antioxidantes, entre outros.

Alguns autores encontraram resultados semelhantes quando utilizaram alguns dos componentes presentes no produto, de forma isolada ou em associação, como a L-carnitina (Stradaioli et al., 2004), antioxidantes e ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs; Brinsko et al., 2005; Contri et al., 2011; Garmsir et al., 2014; Schmid-Lausigk & Aurich, 2014), com conseqüente incremento na qualidade seminal de garanhões, após a sua suplementação oral.

Os dados das motilidades total e progressiva obtidos no experimento foram sempre superiores no grupo tratamento quando comparados aos do grupo controle ( $P < 0,05$ ), tanto para o sêmen fresco e em todos os momentos de refrigeração (24h, 36h e 48h), quanto para os espermatozoides pós-descongelamento (Tabelas 2.2, 2.4 e 2.6). Esse incremento observado na cinética espermática dos animais que receberam a suplementação com o nutracêutico pode ser explicado pela ação da L-carnitina, que desempenha um papel vital no metabolismo do espermatozoide fornecendo energia prontamente disponível (Matalliotakis et al., 2000).

Ao administrar L-carnitina para garanhões oligostenospermicos, Stradaioli et al. (2004) observaram um aumento da motilidade progressiva no sêmen fresco desses animais. Com isso concluíram que os níveis de carnitina e acetilcarnitina no plasma seminal e no sêmen fresco de garanhões se correlacionaram positivamente com a concentração espermática e a

motilidade progressiva do sêmen. Além disso, esses autores encontraram uma relação entre a quantidade de acetilcarnitina, presente no sêmen, com o total de espermatozoides móveis morfolologicamente normais.

No presente trabalho, não observou-se alterações na concentração espermática, assim como na avaliação da morfologia dos espermatozoides. De modo semelhante, Lenzi et al. (2004) não observaram alterações na concentração e na morfologia espermática no sêmen de homens com astenozoospermia após a suplementação oral com L-carnitina e L-acetilcarnitina, mas, assim como nos resultados encontrados neste experimento, obtiveram um aumento na motilidade total e progressiva no sêmen fresco dos pacientes que receberam a suplementação oral.

Como apresentado nas Tabelas 2.2, 2.4 e 2.6, houve superioridade da velocidade de trajeto (VAP) para o grupo tratamento em relação ao grupo controle para o sêmen fresco, refrigerado e criopreservado ( $P < 0,05$ ). Da mesma forma, a velocidade retilínea (VSL) foi superior no grupo tratamento para o sêmen refrigerado por 24h e pós-descongelamento. Correlações altamente positivas entre os parâmetros de motilidade progressiva e os parâmetros de velocidade do sêmen, indicam que espermatozoides com uma boa velocidade linear e retilinearidade percorrem longas distâncias em um menor tempo. A Velocidade de trajeto (VAP) e a velocidade retilínea (VSL) também possuem uma forte correlação positiva com a fertilidade do sêmen, por isso, podem ser utilizadas para estimar a fertilidade de amostras seminais (Kathivaran et al., 2008).

Além da ação da L-carnitina, essa superioridade na cinética espermática dos animais que receberam o tratamento com o nutracêutico pode ter ocorrido pela ação da vitamina E e do selênio. Considerados os princípios antioxidantes utilizados como nutracêuticos com a função de melhorar a qualidade espermática do sêmen de animais (Deichsel et al., 2008; Castellano et al., 2010; Gholami et al., 2010; Contri et al., 2011; Schmid-Lausigk & Aurich, 2014).

Os dados da cinética espermática dos garanhões que receberam o nutracêutico assemelham-se com os encontrados por Contri et al. (2011), que relataram superioridade de velocidade de trajeto e retilinearidade após 30 dias de suplementação com nutracêutico contendo vitamina E, selênio e zinco e um aumento da motilidade progressiva do sêmen e de espermatozoides morfolologicamente normais, após 60 dias do início da suplementação.

O percentual de espermatozoides com a membrana plasmática íntegra e os espermatozoides íntegros sem reação acrossomal também foi superior para o sêmen dos animais do grupo tratamento com relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ), Tabelas 2.3, 2.5 e 2.7. Essa

superioridade pode ter ocorrido devido ao mecanismo de ação dos ácidos graxos poliinsaturados presentes no nutracêutico, que são essenciais para a manutenção da estrutura, função e integridade da membrana plasmática dos espermatozoides. Como o ácido docosahexaenóico (DHA, um ômega 3) e o ácido docosapentaenóico (DPA, um ômega 6), que estão presentes em altos níveis no sêmen de todas as espécies domésticas (Colenbrander et al., 1999). A sua obtenção através da dieta é fundamental, já que os animais não conseguem sintetizar os PUFAs em seu organismo (Arruda et al., 2010).

Sendo assim, com o intuito de diminuir o estresse físico e aumentar a estabilidade das membranas do espermatozoide, é realizada a suplementação de ômega 3 e 6 na dieta de garanhões (Brinsko et al., 2005; Grady et al., 2009; Garmsir et al., 2014; Schmid-Lausigk & Aurich, 2014), considerando que o estresse físico relacionado à refrigeração e à criopreservação do sêmen é uma das principais causas de danos à membrana plasmática dos espermatozoides (Pena et al., 2011).

A suplementação de PUFAs, de forma isolada, na dieta de garanhões apresenta resultados contraditórios na literatura. Grady et al. (2009) não observaram nenhum efeito após a suplementação de PUFAs na dieta de garanhões, porém Brinsko et al. (2005) relatam uma melhora na qualidade do sêmen refrigerado de garanhões após a suplementação de ômega 3.

Os resultados obtidos, no presente trabalho, com o aumento da integridade de membrana plasmática e acrossomal e o aumento dos parâmetros cinéticos após a refrigeração do sêmen corroboram com os encontrados por Brinsko et al. (2005), que obtiveram um aumento da proporção de DHA presente no sêmen dos animais, que levou à uma melhora dos parâmetros cinéticos, no sêmen refrigerado dos garanhões. Esses autores ressaltaram que, o aumento na qualidade do sêmen, foi mais evidente em animais que, inicialmente, apresentavam uma baixa qualidade espermática no sêmen refrigerado.

A perda da integridade das membranas dos espermatozoides, geradas pela peroxidação lipídica, pode levar ao aumento da permeabilidade celular, acarretando em perda na capacidade da célula de regular a concentração intracelular de íons envolvidos no controle da motilidade espermática. Dessa forma, a peroxidação lipídica excessiva, além de lesar a membrana plasmática, pode diminuir a motilidade e a capacidade fertilizante do espermatozoide (Aitken & Baker, 2004).

Levando esses fatores em consideração, a suplementação de PUFAs e de antioxidantes em associação pode justificar o aumento da integridade de membrana plasmática e da integridade de membrana acrossomal, que foi observado no sêmen fresco, refrigerado e congelado dos animais que receberam o nutracêutico. Sendo assim, a maior resistência à

peroxidação lipídica dos espermatozoides dos animais que estavam no grupo tratamento, além de ter influenciado na integridade das membranas dos espermatozoides, refletiu também nos seus parâmetros cinéticos.

Outros autores também constataram um aumento da qualidade do sêmen em garanhões (Garmsir et al., 2014), em cachacos (Castellano et al., 2010) e em touros (Gholami et al., 2010) após a suplementação de antioxidantes em conjunto com ácidos graxos poliinsaturados na dieta dos animais.

## **7 CONCLUSÕES**

Os resultados encontrados, após a utilização do produto comercial administrado por 60 dias consecutivos para garanhões, nas condições do experimento, sugerem um incremento na qualidade espermática, tanto para o sêmen fresco como para o refrigerado e criopreservado no que se refere à motilidade total e integridade de membranas plasmática e acrossomal. Porém são necessários mais estudos para determinar como os nutracêuticos atuam na reprodução dos garanhões, e qual a dose ideal de cada substância, para melhorar a qualidade do sêmen de equinos.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITKEN, R.J.; BAKER, M.A. Oxidative stress and male reproductive biology. *Reproduction, Fertility and Development*, v.16, p.581-588, 2004.
- AITKEN, R.J.; HARKISS, D.U.; BUCKINGHAM, D.E. Analysis of lipid peroxidation mechanism in human spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, v.35, p.302-315, 1993.
- ARRUDA, R.P.; SILVA, D.F.; ALONSO, M.A.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; GALLEGOS, A.M.; MARTINS, S.M.M.K.; GRANATO, T.M. Nutraceuticals in reproduction of bulls and stallions. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.39, p.393-400, 2010.
- BRINSKO, S.T.; VARNER, D.D.; LOVE, C.C.; BLANCHARD, T. L.; 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.
- CASTELLANO, C.A.; AUDET, I.; BAILEY, J.L.; LAFOREST, J.P.; MATTE, J.J. Dietary omega-3 fatty acids (fish oils) have limited effects on boar semen stored at 17 °C or cryopreserved. *Theriogenology*, v.74, p.1482-1490, 2010.
- CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal, 3ed. Belo Horizonte, 2013.
- COLENBRANDER, B.; FAZELI, A.R.; VAN BBUITEN, A.; PARLEVLIET, J. GADELLA, B.M. Assessment of sperm cell membrane integrity in the horse. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v.88 (Suppl.), p.49, 1999.
- CONTRI, A.; AMICIS, I.; MOLINARI, A.; FAUSTINI, M.; GRAMENZI, A.; ROBBE, D.; CARLUCCIO, A. Effect of dietary antioxidant supplementation on fresh semen quality in stallion. *Theriogenology*, v.75, p.1319-1326, 2011.
- 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, p.940-945, 2008.

GARMSIR, A.K.; SHAHNEH, A.Z.; JALALI, S.M.A.; NOURI, H.; AFSHAR, M. Effects of dietary Thyme (*Thymus vulgaris*) and fish oil on semen quality of miniature Caspian horse. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.34, p.1069-1075, 2014.

GLIOZZI, T. M.; ZANIBONI, L.; MALDJIAN, A.; LUZI, F.; MAERTENS, L.; CEROLINI, S. Quality and lipid composition of spermatozoa in rabbit fed DHA and vitamin E rich diets. *Theriogenology*, v.71, p.910-919, 2009.

GHOLAMI, H.; CHAMANI, M.; TOWHIDI, A.; FAZELI, M.H. Effect of feeding a docosahexaenoic acid-enriched nutraceutical on the quality of fresh and frozen-thawed semen in Holstein bulls. *Theriogenology*, v.74, p.1548-1558, 2010.

GRADY, S.T.; CAVINDER, C.A.; BRINSKO, S.P.; FORREST, D.W.; SAWYER, J.E.; SCOTT, B.D. Dietary supplementation of two varying sources of n-3 fatty acids and subsequent effects on fresh, cooled and frozen seminal characteristics of stallions. *The Professional Animal Scientist*, v.25, p.768-773, 2009.

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.

HULSE, J. D.; ELLIS, S. R.; HENDERSON, L. M. Carnitine biosynthesis. Beta-hydroxylation of trimethyllysine by an alpha-ketoglutarate-dependent mitochondrial dioxygenase. *Journal of Biological Chemistry*, v.253, p.1654-1659, 1978.

JEULIN, C.; DACHEUX, J. L.; SOUFIR, J. C. Uptake and release of free L-carnitine by boar epididymal spermatozoa in vitro and subsequent acetylation rate. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.100, p.263-271, 1994.

JONES, R.; MANN, T. Lipid peroxidation in spermatozoa. *Proceedings of the Royal Society of London - Series B: Biological sciences*, v.184, p.103-107, 1973.

KAO, S. H.; CHAO, H. T.; CHEN, H. W.; HWANG, T. I. S.; LIAO, T. L.; WEI, Y. H. Increase in oxidative stress in human sperm with lower motility. *Fertility and Sterility*, v.89, p.1183-1190, 2008.

KATHIRAVAN, P.; KALATHARAN, J.; EDWIN, M.J.; VEERAPANDIAN, C. Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with in vitro fertility in zona-free hamster oocytes. *Animal Reproduction Science*, v.104, p.9-17, 2008.

KLINC, P.; RATH, D. Reduction of oxidative stress in bovine spermatozoa during flow cytometric sorting. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 42, p. 63-67, 2007.

LENZI, A.; SGRÒ, P.; SALACONE, P.; PAOLI, D.; GILIO, B.; LOMBARDO, F.; SANTULLI, M.; AGARWAL, A.; GANDINI, L. A placebo-controlled double-blind randomized trial of the use of combined L-carnitine and L-acetyl-carnitine treatment in men with asthenozoospermia. *Fertility and Sterility*, v.81, n.6, p.1578-1584, 2004.

LITTELL, R. C.; STROUP, W. W.; FREUND, R. J. SAS<sup>®</sup> for linear models. 4. ed., Cary: SAS Institute, 2002, 466p.

MAGISTRINI, M.; VIDAMET, M.; CLEMENT, F.; PALMER, E. Fertility prediction in stallions. *Animal Reproduction Science*, v.42, p.181-188, 1996.

MATALLIOTAKIS, I.; YOUMANTAKI, Y.; EVANGELIOU, A.; MATALLIOTAKIS, G.; GOUMENOU, A.; KOUMANTAKIS E. L-carnitine levels in the seminal plasma of fertile and infertile men: correlation with semen quality. *International Journal of Fertility*, v.45, p.236-240, 2000.

PALMERO, S.; BOTTAZI, C.; COSTA, M.; LEONE, M.; FUGASSA, E. Metabolic effects of L-carnitine on prepubertal rat Sertoli cells. *Hormone and Metabolic Research*, v.32, p.87-90, 2000.

PARLEVLIET, J.M.; COLENBRANDER, B. Prediction of first season stallion fertility of 3-year-old Dutch Warmblood with prebreeding assessment of percentage of morphologically normal live sperm. *Equine Veterinary Journal*, v.31, p.248-251, 1999.

PENA, F.J.; GARCIA, B.M.; SAMPER, J.C.; APARICIO, I.M.; TAPIA, J.A.; FERRUSOLA, C.O. Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: the way to improve current cryopreservation protocols? *Theriogenology*, v.76, p.1177-1186, 2011.

RYAN, T. C.; WEIL, G. J.; NEWBURGER, P. E.; HAUGLAND, R.; SIMONS, E. R. Measurement of superoxide release in the phagocytosomes of immune complex-stimulated human neutrophils. *Journal of Immunological Methods*, v.130, p.223-233, 1990.

SAEG. Sistema para análises estatísticas, Versão 9.0. Viçosa: FUNARBE, 2005.

SCHMID-LAUSIGK, Y.; AURICH, C. Influences of a diet supplemented with linseed oil and antioxidants on quality of equine semen after cooling and cryopreservation during winter. *Theriogenology*, v.81, p.966-973, 2014.

STRADAIOLI, G.; SYLLA, L.; ZELLI, R.; SUPPLIZI, A.V.; CHIODI, P.; ARDUINI, A.; MONACI, M. Seminal carnitine and acetylcarnitine content and carnitine acetyltransferase activity in young Maremmano stallions. *Animal Reproduction Science*, v.64, p.233-245, 2000.

STRADAIOLI, G.; SYLLA, L.; ZELLI, R.; CHIODI, P.; MONACI, M. Effect of L-carnitine administration on the seminal characteristics of oligoasthenospermic stallions. *Theriogenology*, v.62, p.761-777, 2004.