



## Efeito do ácido docosa-hexaenoico e do Trolox<sup>®</sup> no diluidor de refrigeração de sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador

[*Effect of docosahexaenoic acid and Trolox<sup>®</sup> in extenders for cooling semen from Mangalarga Marchador stallion*]

C.S. Aguiar<sup>1</sup>, C.H.S.C. Barros<sup>1</sup>, W.M. Machado<sup>1</sup>, I.B. Allaman<sup>2</sup>,  
L.P. Barbosa<sup>3</sup>, P.P.N. Snoeck<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Aluno de pós-graduação - Universidade Estadual de Santa Cruz - Ilhéus, BA

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Santa Cruz - Ilhéus, BA

<sup>3</sup>Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - Cruz das Almas, BA

### RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito do ácido docosa-hexaenoico (DHA), associado ou não ao Trolox<sup>®</sup>, na refrigeração de sêmen de garanhões da raça Mangalarga Marchador. Foram refrigerados 10 ejaculados nos diluidores: D1) BotuSêmen<sup>®</sup> (BS; controle); D2) BS + 30ngmL<sup>-1</sup> de DHA (BS30DHA); D3) BS30DHA + 40µM de Trolox<sup>®</sup> (BS30DHA40T); D4) BS + 50ngmL<sup>-1</sup> de DHA (BS50DHA); D5) BS50DHA + 40µM de Trolox<sup>®</sup> (BS50DHA40T). Após 48 horas de refrigeração, foram avaliados os parâmetros de movimento espermático, a integridade estrutural e funcional da membrana plasmática e a longevidade espermática. Todos os diluidores testados preservaram, de forma semelhante, a motilidade, a linearidade, a retilinearidade, a amplitude do deslocamento lateral da cabeça, a frequência do batimento flagelar cruzado, o percentual de hiperativos e a integridade estrutural e funcional da membrana espermática ( $P>0,05$ ). O diluidor BS50DHA foi superior ao BS30DHA40T em preservar a VCL e a VSL e foi superior ao BS30DHA40T e ao BS50DHA40T em preservar a VAP e o índice de oscilação ( $P<0,05$ ). Conclui-se que o uso do Trolox<sup>®</sup> em diluidores utilizados para refrigeração de sêmen de garanhões contendo ácido docosa-hexaenoico, nas concentrações propostas, não é indicado por alterar parâmetros de movimento espermático considerados importantes para a fertilidade.

Palavras-chave: antioxidante, ácidos graxos, espermatozoide, criopreservação, equino

### ABSTRACT

*The objective of this study was to evaluate the effect of docosahexaenoic acid (DHA), associated or not with Trolox<sup>®</sup>, in extenders for cooling semen from Mangalarga Marchador stallions. Ten ejaculates were cooled in the following diluents: D1) BotuSemen<sup>®</sup> (BS; control); D2) BS + 30ngmL<sup>-1</sup> DHA (BS30DHA); D3) BS30DHA + 40µM Trolox<sup>®</sup> (BS30DHA40T); D4) BS + 50ngmL<sup>-1</sup> DHA (BS50DHA); D5) BS50DHA + 40µM Trolox<sup>®</sup> (BS50DHA40T). After 48 hours of refrigeration, the sperm movement, structural and functional integrity of the plasma membrane and sperm longevity were evaluated. All extenders tested similarly preserved motility, linearity, straightness of trajectory, amplitude of lateral head displacement, beat cross frequency, hyperactive, the structural and functional integrity of the sperm membrane ( $P> 0.05$ ). The BS50DHA extender was superior to BS30DHA40T in preserving VCL and VSL and was superior to BS30DHA40T and BS50DHA40T in preserving VAP and oscillation index ( $P< 0.05$ ). It is concluded that the use of Trolox<sup>®</sup> in extenders for cooling stallion sperm containing docosahexaenoic acid at the proposed concentrations is not indicated because it alters sperm movement parameters considered important for fertility.*

Keywords: antioxidant, fatty acids, sperm, cryopreservation, equine

### INTRODUÇÃO

O uso do sêmen refrigerado e transportado em caixas isotérmicas é uma prática corriqueira na indústria equina em várias partes do mundo,

auxiliando na difusão da técnica de inseminação artificial, pois a utilização de sêmen congelado nessa espécie encontra vários fatores limitantes para se tornar rotina (Loomis, 2006), principalmente, em decorrência de a taxa de fertilidade obtida ser mais baixa. Um dos principais entraves para sua utilização está

Recebido em 8 de junho de 2018

Aceito em 17 de janeiro de 2019

E-mail: aguiarcs@gmail.com

relacionado à própria espécie, pois muitos ganhões possuem características de viabilidade espermática insatisfatórias pós-descongelamento (Alvarenga e Carmo, 2007). Diante disso, o uso do sêmen refrigerado é uma forma mais viável de maximizar o aproveitamento desses ganhões (Vidament *et al.*, 1997). Vale ressaltar que os reprodutores da raça Mangalarga Marchador integram o grupo de animais que possuem espermatozoides sensíveis às técnicas de criopreservação (Alvarenga *et al.*, 2005).

Um dos prejuízos decorrentes do processo de criopreservação é a deterioração oxidativa de lipídios poli-insaturados da membrana plasmática dos espermatozoides, os quais são componentes celulares mais atingidos pelas espécies reativas ao oxigênio (ROS), resultando em lesões lipoperoxidativas responsáveis por inviabilizar essa célula para o processo de fertilização do oócito (Alvarez *et al.*, 2006), em decorrência da diminuição da motilidade, de lesões na membrana plasmática e de fragmentação do DNA, acarretando queda da fertilidade (Varner *et al.*, 2015).

Portanto, o acréscimo de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) na membrana plasmática pode beneficiar a motilidade e demais parâmetros do espermatozoide durante seu armazenamento refrigerado (Takahashi *et al.*, 2012), a exemplo do DHA, que, ao ser adicionado ao diluidor, é incorporado pela membrana plasmática celular (Nasiri *et al.*, 2012; Towhidi e Parks, 2012). No entanto, as duplas ligações presentes nos PUFAs são facilitadoras da lipoperoxidação iniciada principalmente pelo radical hidroxila, levando a uma reação em cascata (Ball e Vo, 2002), que pode ocasionar alteração da fluidez da membrana plasmática e comprometer a fertilização (Sanocka e Kurpiz, 2004). É importante salientar que as membranas, plasmática e acrossomal, são protegidas pelo alfatocoferol, capaz de cessar a reação em cadeia da lipoperoxidação em biomembranas (Sikka, 2004). O Trolox<sup>®</sup>, seu análogo hidrossolúvel, possui potente propriedade antioxidante (Wu *et al.*, 1991).

Diante do exposto, espera-se que a associação do DHA com o antioxidante Trolox<sup>®</sup> em diluidores seminais possa melhorar a resistência dos espermatozoides durante o transporte refrigerado e garantir melhores taxas de prenhez. Por isso,

objetivou-se avaliar o efeito de duas diferentes concentrações de DHA, associado ou não a uma concentração fixa de Trolox<sup>®</sup>, sobre os espermatozoides refrigerados de ganhões da raça Mangalarga Marchador.

## MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal Ceua/Uesc da Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Bahia, Brasil, com o número de protocolo 004/16. Todos os reagentes utilizados foram puros para análise e adquiridos da empresa Sigma-Aldrich<sup>®</sup> (St. Louis, MO, USA).

O experimento foi realizado em haras localizado no município de Itabuna, Bahia, Nordeste, Brasil (latitude 14°47'08"S, longitude 39°16'49"W, altitude 54m e área 443km<sup>2</sup>, mesorregião geográfica do Sul Baiano), em agosto de 2017. O local possui clima tropical chuvoso, bioma mata atlântica, pluviosidade média anual de 1.300mm e temperatura média anual de 23,6°C, umidade acima de 80% (Anuário, 2017). As análises seminais foram realizadas no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Estadual de Santa Cruz.

Foram utilizados 10 ganhões saudáveis da raça Mangalarga Marchador, com idade variando entre sete e nove anos, com escore da condição corporal 3,5. Foram feitas duas coletas em cada ganhão, com intervalo de uma hora, com vagina artificial modelo Botucatu<sup>®</sup> (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil), com temperatura interna entre 42 e 45°C e auxílio de uma fêmea em estro como manequim. O primeiro ejaculado de cada ganhão foi descartado, e o segundo submetido ao processo de refrigeração para minimizar possíveis variações de qualidade espermática, tendo em vista que nem todos os ganhões estavam sob o mesmo regime de coleta de sêmen.

A fração gel do ejaculado foi removida com o auxílio de um filtro de nylon (Minitube<sup>®</sup>, Alemanha), e o volume do ejaculado mensurado em proveta graduada. Todos os ejaculados foram avaliados macro e microscopicamente segundo o CBRA (Manual..., 2013), antes da refrigeração. Somente os ejaculados com motilidade mínima de 60%, vigor espermático de 3 e 70% de

### *Efeito do ácido...*

espermatozoides morfológicamente normais foram refrigerados.

O DHA e o Trolox<sup>®</sup> foram adicionados aos diluidores de sêmen após o preparo de uma solução estoque. A solução estoque de DHA foi calculada considerando seu peso molecular de 328,49g/mol e diluída em 100mL de solução de etanol a 0,05% ( $76,1058 \times 10^{-4}$  mol/L). A solução estoque de Trolox<sup>®</sup> foi preparada e diluída em solução de Tris-ácido cítrico (Maia *et al.*, 2010), considerando seu peso molecular de 250,29g/mol (a 10mM; 0,0125g de Trolox em 5mL de tampão Tris). O sêmen a ser refrigerado foi dividido e diluído (sêmen:diluidor) para concentração de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL nos seguintes diluidores a 37°C: D1) BotuSêmen<sup>®</sup> (BS; controle); D2) BS +  $30 \text{ngmL}^{-1}$  de DHA (BS30DHA); D3) BS30DHA +  $40 \mu\text{M}$  de Trolox<sup>®</sup> (BS30DHA40T); D4) BS +  $50 \text{ngmL}^{-1}$  de DHA (BS50DHA); D5) BS50DHA +  $40 \mu\text{M}$  de Trolox<sup>®</sup> (BS50DHA40T).

Após a diluição, as amostras de sêmen de cada ganhão foram acondicionadas em tubos cônicos de centrifugação de 15mL, em um sistema de armazenamento e transporte do tipo BotuFLEX<sup>®</sup> (Botupharma, Botucatu, SP, Brasil), os quais foram lacrados por um período de 48 horas. A temperatura final do armazenamento do sêmen refrigerado adotada no sistema isotérmico BotuFLEX<sup>®</sup> foi de 5°C após queda de aproximadamente 0,05°C/min. Para isso, foram utilizados dois gelos recicláveis próprios da caixa térmica e um tubo extra contendo água, para garantir o volume máximo de líquido (200mL) em seu interior, preconizado pelo fabricante.

Transcorrido o período de 48 horas, as amostras foram retiradas da BotuFLEX<sup>®</sup> e colocadas em banho seco à temperatura de 37°C para avaliação dos parâmetros de movimento espermático, integridade estrutural e funcional da membrana plasmática e morfologia espermática. O movimento espermático foi avaliado após cinco e 120 minutos de incubação a 37°C, por um sistema computadorizado Sperm Class Analyser<sup>®</sup> (SCA<sup>®</sup>; Microoptics S.L, v.5.2, Barcelona, Espanha). Os padrões utilizados do programa foram: 25 imagens/segundo com 25Hz; tamanho de partícula capturado entre 4 e  $75 \mu\text{m}^2$ ; espermatozoides considerados imóveis  $<10 \mu\text{m/s}$ , lento  $<45 \mu\text{m/s}$ , médios de 45 a  $90 \mu\text{m/s}$  e rápido acima de  $90 \mu\text{m/s}$ . Foram avaliados os seguintes

parâmetros: motilidade, linearidade (LIN), retilinearidade (STR), índice de oscilação (WOB) e hiperativos, expressos em porcentagem (%); velocidade curvilínea (VCL), velocidade linear progressiva (VSL) e velocidade média do trajeto (VAP), expressas em micrômetros por segundos ( $\mu\text{m/s}$ ); amplitude do deslocamento lateral da cabeça espermática (ALH), expressa em micrômetros ( $\mu\text{m}$ ); e frequência do batimento flagelar cruzado (BCF), expressa em Hertz (Hz).

A integridade estrutural das membranas plasmática e acrossomal foi avaliada utilizando-se um microscópio fluorescente (400x; Olympus<sup>®</sup> BX31) após a coloração do espermatozoide com corantes fluorescentes diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (IP) (Harrison e Vickers, 1990). A coloração com CFDA foi avaliada usando-se o conjunto padrão de filtro de fluoresceína, enquanto a coloração com IP foi avaliada usando-se o conjunto padrão de filtros de rodamina. Foram analisados 200 espermatozoides por amostra.

A integridade funcional da membrana plasmática foi avaliada utilizando-se o teste hiposmótico (HOST), com  $50 \mu\text{L}$  da amostra diluída em  $500 \mu\text{L}$  de uma solução de sacarose a  $100 \text{mOsmol/L}$ . As amostras diluídas foram primeiramente incubadas em banho seco a 37°C, durante 30 minutos, e posteriormente foram fixadas com  $250 \mu\text{L}$  de solução de citrato de sódio formolizado a 4%. Foram avaliadas 200 células usando-se um microscópio de contraste de fase (1000x; Olympus<sup>®</sup> BX31). A porcentagem de células reativas ao HOST e funcionalmente íntegras foi calculada de acordo com o método de Melo e Henry (1999), conforme a seguir:  $\text{HOST\%} = \% \text{ de alterações na região da cauda após o HOST} - \% \text{ de alterações na região da cauda antes do HOST}$ , identificadas na avaliação da morfologia espermática, antes de submeter as amostras ao HOST. A morfologia espermática foi avaliada por meio da técnica de preparação úmida, em amostras fixadas em citrato de sódio formolizado a 4%, após o processo de refrigeração. Foram avaliadas 200 células, mediante o uso de um microscópio de contraste de fase (1000x; Olympus<sup>®</sup> BX31).

O desenho experimental foi em blocos ao acaso, considerando-se o ganhão como um bloco. Foi utilizada análise de variância para testar as

diferenças entre os tratamentos. Todos os pressupostos foram testados e, quando violados, foi utilizada a transformação boxcox por meio da função “boxcox” do pacote MASS, versão 7.3-41. O teste de Tukey foi utilizado para as comparações múltiplas, e o de Friedman para as variáveis com violação dos pressupostos da ANOVA. As variáveis transformadas foram: VCL, ALH e hiperativos. O nível de significância adotado foi de 5%. Todas as análises foram feitas com o auxílio do R Core Team (2019).

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Depois do processo de refrigeração, houve uma diminuição acentuada da qualidade seminal, tendo em vista que as características macroscópicas e microscópicas do sêmen fresco, antes da refrigeração, foram: volume médio de

40,7±14,9mL, motilidade total média de 79,5±4,4%, motilidade progressiva média de 73,5±5,8%, vigor espermático médio de 3,85±0,6 (escala 0-5), percentual de espermatozoides morfológicamente normais e com membrana funcionalmente íntegra de 73,8±8,3 e 55,7±8,0, respectivamente.

Todos os diluidores preservaram, de forma semelhante, a motilidade, a LIN, a STR, o ALH, a BCF e os hiperativos, além da integridade estrutural e funcional das membranas após 48 horas de armazenamento e refrigeração (P>0,05). No entanto, o diluidor adicionado de 50ngmL<sup>-1</sup> de DHA foi superior ao adicionado de 30ngmL<sup>-1</sup> de DHA e 40µM de Trolox® em preservar a VCL e a VSL dos espermatozoides (P<0,05) e superior ao diluidor adicionado de 30ngmL<sup>-1</sup> e 50ngmL<sup>-1</sup> de DHA contendo 40µM de Trolox® para preservar a VAP e o WOB (P<0,05; Tab. 1).

Tabela 1. Parâmetros de viabilidade espermática após 48 horas de armazenamento do sêmen refrigerado a 5°C, em diluidor BotuSêmen®, com ou sem Trolox® e com diferentes concentrações de DHA

Parâmetros	Diluidores					EPM	P-valor
	BS	BS	BS	BS	BS		
	0DHA 0T	30DHA 0T	30DHA 40T	50DHA 0T	50DHA 40T		
Motilidade (%)	23,0	20,6	30,8	28,3	29,7	3,1	0,10
VCL (µm/s) *	36,2 <sup>ab</sup>	35,1 <sup>ab</sup>	28,9 <sup>b</sup>	39,5 <sup>a</sup>	33,2 <sup>ab</sup>	0,0	0,00
VSL (µm/s)	14,6 <sup>ab</sup>	14,3 <sup>ab</sup>	9,6 <sup>b</sup>	19,3 <sup>a</sup>	13,4 <sup>ab</sup>	1,5	0,00
VAP (µm/s)	22,0 <sup>ab</sup>	21,2 <sup>ab</sup>	14,6 <sup>b</sup>	26,0 <sup>a</sup>	18,0 <sup>b</sup>	1,9	0,00
LIN (%)	41,1	41,0	35,0	48,4	39,8	3,0	0,05
STR (%)	68,3	68,4	66,1	72,8	72,8	2,6	0,27
WOB (%)	60,2 <sup>ab</sup>	59,8 <sup>ab</sup>	52,3 <sup>b</sup>	65,8 <sup>a</sup>	54,5 <sup>b</sup>	2,5	0,00
ALH (µm) *	3,3	2,8	3,1	2,6	2,8	0,8	0,06
BCF (Hz)	10,7	9,5	10,7	8,2	9,6	0,7	0,11
Hiperativos (%)*	2,4	2,8	3,1	2,6	2,8	0,1	0,36
CFDA+ (%)	33,9	30,7	34,0	35,0	40,0	2,3	0,08
HOSTr (%)	14,1	20,9	22,6	18,2	21,7	3,1	0,31

D1) BotuSêmen® (BS) (controle); D2) BS + 30ngmL<sup>-1</sup> de DHA (BS30DHA); D3) 30DHA + 40µM de Trolox® (BS30DHA40T); D4) BS + 50ngmL<sup>-1</sup> de DHA (BS50DHA); D5) 50DHA + 40µM de Trolox® (BS50DHA40T). Parâmetros avaliados pelo SCA® após a refrigeração: motilidade; velocidade curvilínea (VCL); velocidade linear progressiva (VSL); velocidade média do trajeto (VAP); linearidade (LIN); retilinearidade (STR); índice de oscilação (WOB); amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH); hiperativos; frequência do batimento flagelar cruzado (BCF). Espermatozoides com membrana estrutural íntegra (CFDA+). Espermatozoides reativos ao teste hiposmótico e funcionalmente íntegros (HOSTr). <sup>ab</sup>As letras sobrescritas indicam diferenças dentro da linha (P<0,05). \*Variáveis transformadas por meio da função Box Cox.

Foi possível identificar que oito dos 10 ganhões utilizados no experimento foram considerados ganhões “bad coolers”, segundo Brinsko et al. (2000), em decorrência de o processo de refrigeração ter reduzido o percentual de espermatozoides móveis em mais

de 40%, pois estes apresentaram motilidade inferior a 30% depois de 48h de refrigeração. Para essa categoria de ganhões, foi possível perceber que a VCL foi mais bem preservada nos diluidores contendo DHA sem Trolox® (P<0,05), e a VSL e a VAP foram mais bem preservadas

### Efeito do ácido...

nos diluidores controle e contendo DHA sem Trolox® (P<0,05; Tab. 2). A VCL e a VSL são parâmetros que afetam a probabilidade de gestação (Silva *et al.*, 2017) e, de acordo com Vidament (2005), os valores de VAP interferem na taxa de prenhez por ciclo. Os parâmetros de

motilidade, LIN, STR, ALH, BCF e integridade estrutural e funcional das membranas foram preservados de forma semelhante em todos os diluidores utilizados no processo de refrigeração para esses ganhões (P>0,05).

Tabela 2. Parâmetros de movimento espermático após 48 horas de armazenamento do sêmen de ganhões “bad coolers” refrigerado a 5°C em diluidor BotuSêmen®, com ou sem Trolox® e com diferentes concentrações de DHA

Parâmetros	Diluidores					EPM	P-valor
	BS	BS	BS	BS	BS		
	0DHA	30DHA	30DHA	50DHA	50DHA		
VCL (µm/s)	25,0 <sup>b</sup>	26,9 <sup>a</sup>	21,0 <sup>b</sup>	31,2 <sup>a</sup>	22,3 <sup>b</sup>	2,47	0,039
VSL (µm/s)	11,0 <sup>a</sup>	12,2 <sup>a</sup>	7,8 <sup>b</sup>	15,0 <sup>a</sup>	8,7 <sup>b</sup>	1,38	0,003
VAP (µm/s)	16,2 <sup>a</sup>	17,4 <sup>a</sup>	11,6 <sup>b</sup>	20,9 <sup>a</sup>	11,9 <sup>b</sup>	1,80	0,002

D1) BotuSêmen® (BS) (controle); D2) BS + 30ngmL<sup>-1</sup> de DHA (BS30DHA); D3) 30DHA + 40µM de Trolox® (BS30DHA40T); D4) BS + 50ngmL<sup>-1</sup> de DHA (BS50DHA); D5) 50DHA + 40µM de Trolox® (BS50DHA40T). Parâmetros avaliados pelo SCA® após a refrigeração: velocidade curvilinear (VCL); velocidade linear progressiva (VSL); velocidade média do trajeto (VAP).<sup>ab</sup> As letras sobrescritas indicam diferenças dentro da linha (P<0,05).

Para garantir melhor velocidade de movimento dos espermatozoides de ganhões considerados “bad coolers”, o diluidor seminal pode ter, na sua formulação, a adição de 30 ou 50ngmL<sup>-1</sup> de DHA. Sabe-se que o DHA tem a capacidade de remodelar os glicerofosfolípídeos da membrana plasmática e que estes, junto com os seminolípídeos, são essenciais para várias funções do espermatozoide equino, como: motilidade, ligação com a zona pelúcida e fertilização (Wood *et al.*, 2016). É sabido também que o sêmen que apresenta espermatozoides com maior velocidade produz mais de 50% de óocitos fertilizados do que o sêmen com espermatozoides com baixa velocidade, sendo, nesses casos, a taxa de fertilização de óocito menor que 50% (Verstegen *et al.*, 2002).

A VAP e o WOB foram mais bem preservados nas amostras refrigeradas em diluidor contendo 50ngmL<sup>-1</sup> de DHA sem Trolox® do que nas amostras com menor ou a mesma quantidade de DHA associado com Trolox®, independentemente da categoria do ganhão. Para os ganhões “bad coolers”, a inclusão do Trolox® ao diluidor teve efeito negativo nos parâmetros de velocidade espermática. Além disso, nas condições deste estudo, a inclusão de Trolox® não foi favorável para parâmetros cinéticos associados à fertilização, pois a habilidade do espermatozoide em percorrer o

trato reprodutivo da fêmea e penetrar no óocito depende da resistência exercida pela secreção ali presente e do potencial hidrodinâmico permitido pela curvatura flagelar. As propriedades cinemáticas definem a sua força de propulsão, fato associado às diferenças na eficiência de migração entre espermatozoides de alguns machos (Cox *et al.*, 2006).

O tratamento do sêmen com alfatocoferol, combinado ou não com o DHA, foi descrito para algumas espécies domésticas, tais como caprina (Ansari *et al.*, 2012), bovina (Nasiri *et al.*, 2012), equina (Sabatini *et al.*, 2012), suína (Jeong *et al.*, 2008) e canina (Michael *et al.*, 2007), com resultados diversos, tanto favoráveis como desfavoráveis ao seu uso. Esses efeitos contraditórios podem estar relacionados, em primeiro lugar, com as diferenças de susceptibilidade à peroxidação lipídica da membrana dos espermatozoides entre as espécies, principalmente relacionadas a diferenças nos conteúdos de antioxidantes e/ou na composição do plasma seminal. O dano oxidativo provavelmente afeta, de forma diferente, as diversas estruturas dos espermatozoides, e isso pode variar entre as espécies. Por outro lado, a ação do alfatocoferol pode variar com a dose considerada de radicais hidroxílicos presentes e, de fato, pode se comportar como um estimulador de oxidação ao invés de um antioxidante (Cao e Cutler, 1993).

A capacidade de neutralização do radical hidroxila pelo Trolox<sup>®</sup> diminui quando este é usado em altas concentrações. Então, o mecanismo envolvido na diminuição da sua capacidade antioxidante quando em altas concentrações pode estar relacionado à sua ligação com os radicais hidroxila e outros radicais de oxigênio produzidos na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e Cu<sup>2+</sup> e, assim, conduzir à formação de muitos outros radicais. Percebe-se que os efeitos benéficos de um antioxidante acontecem respeitando-se um determinado intervalo. Existem diversos tipos de radicais produzidos no sêmen, e a proteção antioxidante contra estes pode não estar relacionada positivamente com suas concentrações (Cao et al., 1993).

A inclusão de DHA e Trolox<sup>®</sup> em diferentes combinações não maximizou o efeito crioprotetor do diluidor controle sobre vários parâmetros de viabilidade espermática, como: motilidade, integridade estrutural e funcional, LIN, STR, ALH, BCF e hiperativos, independentemente da categoria do ganhão. É sabido que ganhões com boa qualidade seminal e boa resistência ao processo de criopreservação respondem de forma semelhante a diferentes tipos de diluidores. No presente estudo, foi

possível identificar dois ganhões considerados “good coolers”, com qualidade seminal pós-refrigeração muito superior aos “bad coolers”. Isso pode explicar um pouco os resultados do presente estudo, tendo em vista que esses reprodutores foram responsáveis por dificultar a identificação de diferenças mínimas entre um ou outro diluidor. Ademais, Elhordoy et al. (2008) chamaram atenção para o fato de que a suplementação oral de DHA só resultou em aumento da produção diária de espermatozoides, bem como em melhoria da qualidade seminal, diante do processo de refrigeração e congelamento em ganhões com baixa qualidade de sêmen e considerados “bad coolers/bad freezers”.

Depois que as amostras ficaram 120 minutos no teste de termorresistência (TTR) lento, não foi observada superioridade de um diluidor sobre o outro, exceto para VSL e VAP (Tab. 3). Esses parâmetros apresentaram maiores valores nas amostras refrigeradas no diluidor com 50ngmL<sup>-1</sup> de DHA e menores no diluidor que continha Trolox<sup>®</sup> (P<0,05). A motilidade espermática e a sua capacidade de produzir energia na forma de ATP são atributos importantes do espermatozoide que garantem o potencial fertilizante da amostra (Layek et al., 2016).

Tabela 3. Parâmetros de movimento, após 120 minutos de TTR, dos espermatozoides equino armazenados refrigerados a 5°C em diluidor BotuSêmen<sup>®</sup>, com ou sem Trolox<sup>®</sup> e com diferentes concentrações de DHA

Parâmetros	Diluidores					EPM	P-valor
	BS	BS	BS	BS	BS		
	0DHA	30DHA	30DHA	50DHA	50DHA		
	0T	0T	40T	0T	40T		
Motilidade (%) <sup>*</sup>	14,9	17,0	18,4	19,6	16,3	1,4	0,96
VCL (µm/s) <sup>i</sup>	16,5	20,3	15,6	25,3	16,5	1,4	0,07
VSL (µm/s) <sup>i</sup>	7,8 <sup>ab</sup>	10,1 <sup>ab</sup>	5,4 <sup>b</sup>	11,2 <sup>a</sup>	6,1 <sup>ab</sup>	0,4	0,02
VAP (µm/s) <sup>i</sup>	11,0 <sup>ab</sup>	15,7 <sup>ab</sup>	7,8 <sup>b</sup>	16,5 <sup>a</sup>	8,8 <sup>b</sup>	0,7	0,01
LIN (%) <sup>i</sup>	26,9	29,7	20,9	25,6	22,1	1,3	0,12
STR (%) <sup>*</sup>	41,6	44,4	41,5	39,9	41,1	4,9	0,98
WOB (%) <sup>*</sup>	38,4	40,1	30,0	38,0	32,0	4,3	0,24
ALH (µm) <sup>*</sup>	1,5	1,4	1,7	1,5	1,6	0,2	0,29
BCF (Hz) <sup>*</sup>	4,9	5,5	6,5	4,9	5,8	0,7	0,06
Hiperativos (%) <sup>*</sup>	0,8	1,3	1,1	2,0	1,1	0,2	0,74

D1) BotuSêmen<sup>®</sup> (BS) (controle); D2) BS + 30ngmL<sup>-1</sup> de DHA (30DHA); D3) 30DHA + 40µM de Trolox<sup>®</sup> (30DHA40T); D4) BS + 50ngmL<sup>-1</sup> de DHA (50DHA); D5) 50DHA + 40µM de Trolox<sup>®</sup> (50DHA40T). Parâmetros avaliados pelo SCA<sup>®</sup>: motilidade; velocidade curvilínea (VCL); velocidade linear progressiva (VSL); velocidade média do trajeto (VAP); linearidade (LIN); retilinearidade (STR); índice de oscilação (WOB); amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH); frequência do batimento flagelar cruzado (BCF); hiperativos. <sup>ab</sup>As letras sobrescritas indicam diferenças dentro da linha (P<0,05). <sup>i</sup>Teste de Tukey. <sup>\*</sup>Teste de Friedman.

A motilidade pode ser influenciada positivamente pela adição de DHA ao meio, pois é conhecido que a incorporação desse ácido graxo na membrana plasmática proporciona alteração de sua composição por meio do incremento da proporção entre  $\omega$ -3: $\omega$ -6 (Towhidi e Parks, 2012), favorecendo a sua fluidez e melhorando a motilidade e a intensidade do movimento (Connor *et al.*, 1998). Assim, a adição do DHA ao diluidor, apesar de não ter maximizado o efeito do diluidor controle sobre vários parâmetros, manteve a VSL e a VAP com valores superiores aos diluidores contendo DHA e Trolox<sup>®</sup>, mesmo depois de 48 horas de refrigeração e duas horas de TTR.

Por outro lado, os menores valores de velocidade espermática encontrados nas amostras contendo Trolox<sup>®</sup> podem ser devido ao fator concentração inadequada utilizada nesta combinação crioprotetora, que pode ter influenciado na sua capacidade de neutralização do radical hidroxila (Cao *et al.*, 1993) ou gerado reações bioquímicas indesejáveis que comprometeram a intensidade do movimento.

### CONCLUSÃO

A inclusão de DHA associado ao Trolox<sup>®</sup> não maximizou o efeito do diluidor controle em amostras de sêmen de garanhões Mangalarga Marchador refrigerados por 48 horas. Entretanto, a inclusão isolada de DHA ao diluidor de refrigeração melhorou a velocidade espermática de garanhões “*bad coolers*” e preservou a longevidade dessa característica espermática durante o tempo de incubação no TTR. O uso do Trolox<sup>®</sup> em diluidor de refrigeração de sêmen contendo DHA, nas doses estudadas, não é indicado por alterar negativamente parâmetros de movimento espermático considerados importantes para a fertilidade.

### AGRADECIMENTOS

Aos proprietários de Mangalarga Marchador de Itabuna, região sul da Bahia, Brasil, por disponibilizarem os garanhões para o experimento; aos discentes, bolsistas de iniciação científica do laboratório de reprodução animal da UESC, pelo auxílio nas atividades de campo e laboratoriais; à agência de fomento à pesquisa do estado da Bahia, Fapesb, pelo suporte financeiro.

### REFERÊNCIAS

- ALVARENGA, M.A.; CARMO, M.T. Em reprodução equina: o que há de novo para o veterinário de campo? *Rev. Bras. Med. Equina*, v.14, p.26-29, 2007.
- ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; MEDEIROS, A.S.L. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Anim. Reprod. Sci.*, v.89, p.105-113, 2005.
- ALVAREZ, C.A.; MORAES, G.V.; SCAPINELLO, C. *et al.* Efeito da suplementação de selenometionina e vitamina C sobre a morfopatologia espermática do sêmen de coelho. *Acta Sci. Anim. Sci.*, v.28, p.165-175, 2006.
- ANSARI, M.; TOWHIDI, A.; MORADI SHAHRBABA, M.; BAHREINI, M. Docosahexaenoic acid and alpha-tocopherol improve sperm cryosurvival in goat. *Slovak J. Anim. Sci.*, v.45, p.7-13, 2012.
- ANUÁRIO Estatístico de Itabuna: base de dados 2013-2016. Itabuna: PMI/UESC, 2017. v.1, 304p.
- BALL, B.A.; VO, A. Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C11-BODIPY581/591. *J. Androl.*, v.23, p.259-269, 2002.
- BRINSKO, S.P.; CROCKETT, E.C.; SQUIRES, E.L. Effect of centrifugation and partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and storage. *Theriogenology*, v.54, p.129-136, 2000.
- CAO, G.; ALESSIO, H.M.; CUTLER, R.G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.*, v.14, p.303-311, 1993.
- CAO, G.; CUTLER, R.G. High concentrations of antioxidants may not improve defense against oxidative stress. *Arch. Gerontol. Geriatr.*, v.17, p.189-201, 1993.
- CONNOR, W.E.; LIN, D.S.; WOLF, D.P.; ALEXANDER, M. Uneven distribution of desmosterol and docosahexaenoic acid in the heads and tails of monkey sperm 1. *J. Lipid Res.*, v.39, p.1404-1411, 1998.
- COX, J.F.; ALFARO, V.; MONTENEGRO, V.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. *Theriogenology*, v.66, p.860-867, 2006.
- ELHORDOY, D.M.; CAZALES, N.; COSTA, G.; ESTEVEZ, J. Effect of dietary supplementation with DHA on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v.107, p.319, 2008.
- HARRISON, R.A.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, v.88, p.343-352, 1990.

- JEONG, Y.J.; KIM, M.K.; SONG, H.J. *et al.* Effect of alpha-tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes. *Cryobiology*, v.58, p.181-189, 2008.
- LAYEK, S.S.; MOHANTY, T.K.; KUMARESAN, A.; PARKS, J.E. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Anim. Reprod. Sci.*, v.172, p.1-9, 2016.
- LOOMIS, P.R. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. *Vet. Clin. N. Am. Equine Pract.*, v.22, p.663-676, 2006.
- MAIA, M.S.; BICUDO, S.D.; SICHERLE, C.C. *et al.* Lipid peroxidation and generation of hydrogen peroxide in frozen-thawed ram semen cryopreserved in extenders with antioxidants. *Anim. Reprod. Sci.*, v.122, p.18-123, 2010.
- MANUAL de exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3.ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104p.
- MELO, M.I.V.; HENRY, M. Hypoosmotic test for the evaluation of equine semen. *Arq. Bras. Med.Vet. Zootec.*, v.51, p.71-78, 1999.
- MICHAEL, A.; ALEXOPOULOS, C.; PONTIKI, E. *et al.* Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology*, v.68, p.204-212, 2007.
- NASIRI, A.H.; TOWHIDI, A.; ZEINOALDINI, S. Combined effect of DHA and alpha-tocopherol supplementation during bull semen cryopreservation on sperm characteristics and fatty acid composition. *Andrologia*, v.44, p.550-555, 2012.
- R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2019. URL <http://www.R-project.org/>.
- SABATINI, C.; MONTELLA, M.; PANZANI, D. *et al.* Effect of centrifugation and addition of catalase and/or Trolox® on motility and viability of cooled stallion spermatozoa. *J. Equine Vet. Sci.*, v.32, p.511-512, 2012.
- SANOCKA, D.; KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, v.2, p.12, 2004.
- SIKKA, S.C. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J. Androl.*, v.25, p.5-18, 2004.
- SILVA, C.S.; RODRIGUES, W.B.; POTIENS, J.R. *et al.* Qualidade do sêmen criopreservado e fertilidade de fêmeas bovinas em programas de IATF. In: REUNIÃO DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ANDROLOGIA ANIMAL, 2, 2017, Goiânia. *Anais...Goiânia: [ABRAA]*, 2017. p.171-174. (Resumo).
- TAKAHASHI, T.; ITOH, R.; NISHINOMIYA, H. *et al.* Effect of linoleic acid albumin in a dilution solution and long-term equilibration for freezing of bovine spermatozoa with poor freezability. *Reprod. Domest. Anim.*, v.47, p.92-97, 2012.
- TOWHIDI, A.; PARKS, J.E. Effect of n-3 fatty acids and alpha-tocopherol on post-thaw parameters and fatty acid composition of bovine sperm. *J. Assist. Reprod. Genet.*, v.29, p.1051-1056, 2012.
- VARNER, D.D.; GIBB, Z.; AITKEN, R.J. Stallion fertility: a focus on the spermatozoon. *Equine Vet. J.*, v.47, p.16-24, 2015.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, p.149-179, 2002.
- VIDAMENT, M. French field results (1985–2005) on factors affecting fertility of frozen stallion semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v.89, p.115-136, 2005.
- VIDAMENT, M.; DUPERE, A.M.; JULIENNE, P. *et al.* Equine frozen semen: freezability and fertility field results. *Theriogenology*, v.48, p.907-917, 1997.
- WOOD, P.L.; SCOGGIN, K.; BALL, B.A. *et al.* Lipidomics of equine sperm and seminal plasma: Identification of amphiphilic (O-acyl)- $\omega$ -hydroxy-fatty acids. *Theriogenology*, v.86, p.1212-1221, 2016.
- WU, T.W.; HASHIMOTO, N.; AU, J.X. *et al.* Trolox protects rat hepatocytes against oxyradical damage and the ischemic rat liver from reperfusion injury. *Hepatology*, v.13, p.575-580, 1991.