

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
FACULDADE DE MED. VETERINÁRIA E ZOOTECNIA – FMVZ
DEP. DE RADIOLOGIA E REPRODUÇÃO ANIMAL**

**ESPÉCIES REATIVAS DO METABOLISMO DO OXIGÊNIO,
ANTIOXIDANTES E FUNÇÃO ESPERMÁTICA**

(SEMINÁRIO DE REPRODUÇÃO I)

MARCIANE DA SILVA MAIA

Botucatu
Abril de 2003

MARCIANE DA SILVA MAIA

**ESPÉCIES REATIVAS DO METABOLISMO DO
OXIGÊNIO, ANTIOXIDANTES E FUNÇÃO
ESPERMÁTICA.**

Monografia apresentada à disciplina
Seminários de Reprodução I, do programa
de pós-graduação em medicina veterinária/
reprodução animal, da Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp.

Botucatu,
Abril de 2003

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	4
2. REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1. Radicais livres e espécies reativas do metabolismo do oxigênio	6
a) Radical superóxido (O_2^-)	7
b) Radical hidroxila (OH)	7
c) Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	7
d) Óxido nítrico (ON)	8
2.2. Danos oxidativos causados pelas ROS	8
a) Peroxidação dos lipídios	9
2.3 Sistemas Celulares de Defesa Antioxidante	9
2.3.1. Sistemas enzimáticos	10
a) Superóxido dismutase (SOD)	10
b) Catalase	10
c) Peroxiredoxinas (Prx)	11
d) Glutathione (GSH)	11
e) Glutathione redutase (GR)	11
f) Glutathione peroxidase (GPx)	12
2.3.2. Sistemas não enzimáticos	12
a) Ácido ascórbico (vitamina C)	12
b) α -tocoferol (vitamina E)	13
c) Coenzima Q	13
d) Ácido lipóico	14
2.4 ROS, Antioxidantes e Função Espermiática	14
2.4.1. Geração de ROS no sêmen	14
2.4.2. Sistemas espermiáticos de defesa antioxidante	14
2.4.3. Danos causados ao espermatozóide pelas ROS	18
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	19
4. REFERÊNCIAS	20

1. INTRODUÇÃO

As espécies reativas do metabolismo do oxigênio ou espécies oxigênio reativas (ROS) são formadas e degradadas por todos os organismos aeróbicos, levando a concentrações fisiológicas necessárias para o funcionamento normal da célula, ou a quantidades excessivas, causando danos oxidativos à célula (IMAI & NKAGAWA, 2003; NORDBERG & ARNER, 2001).

O uso fisiológico de ROS pelas células começa a ser demonstrado em áreas como a da sinalização intracelular e regulação redox. O radical superóxido, o peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos de lipídios podem regular a atividade de várias quinases e fatores de transcrição e o mecanismo da morte celular. Várias citocininas, fatores de crescimento, hormônios e neurotransmissores usam ROS como segundo mensageiro. As espécies oxigênio reativas podem também, contribuir para o envelhecimento e muitas doenças humanas como câncer, derrame cerebral, doenças neurodegenerativas e diabetes (IMAI & NKAGAWA, 2003).

As espécies oxigênio reativas incluem um grande número de moléculas quimicamente reativas oriundas do oxigênio, entre elas: o radical superóxido (O^{\bullet}), radical hidroxila (OH^{\bullet}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Algumas dessas moléculas, como o radical hidroxila, são extremamente reativas, enquanto outras, são menos reativas. O radical superóxido gerado a partir do oxigênio molecular pela adição de um elétron é um radical livre, pouco reativo, porque ele tem pouca habilidade para penetrar nas membranas celulares e, portanto fica preso no compartimento onde foi produzido. Radicais superóxido são rapidamente dismutados pelas enzimas: superóxido dismutase mitocondrial (Mn-SOD), superóxido dismutase citoplasmática (Cu, Zn-SOD) e superóxido dismutase extracelular (EC-SOD), produzindo peróxido de hidrogênio (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; NORDBERG & ARNER, 2001).

O radical hidroxila (OH^{\bullet}) é formado a partir do peróxido de hidrogênio em uma reação catalisada por íons metálicos (Fe^{++} ou Cu^{++}), conhecida como reação de Fenton. O OH^{\bullet} reage rapidamente com biomoléculas e pode desencadear a peroxidação dos lipídios nas membranas celulares pela separação de um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos insaturados presentes na mesma. Esse processo leva

á geração de radicais lipídicos (peróxidos de lipídios), que então se combinam com o oxigênio molecular propagando assim, a cadeia de reações da peroxidação dos lipídios. A maioria dos fosfolipídios componentes da membrana são ricos em ácidos graxos polinsaturados, por isso, são susceptíveis ao ataque do radical hidroxila (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; NORDBERG & ARNER, 2001).

Os sistemas fundamentais de defesa celular enzimáticos, contra os danos causados pelo peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos de lipídios são: a glutathione peroxidase, peroxidases e catalase. A glutathione peroxidase converte peróxido de hidrogênio a H₂O, através da oxidação da glutathione a glutathione dissulfido, a sua forma oxidada. A catalase reduz peróxido de hidrogênio a água e O₂. A peroxidase pode reduzir peróxido de hidrogênio a H₂O pela oxidação da tioredoxina (NORDBERG & ARNER, 2001).

O efeito prejudicial das espécies oxigênio reativas, no espermatozóide, foi sugerido a mais de 50 anos atrás, quando MacLeod (1943) *apud* Halliwell & Gutteridge (1999), demonstrou que a exposição do espermatozóide humano a altas concentrações de oxigênio resultava em toxicidade, com perda rápida da sua motilidade.

Estudos posteriores têm confirmado que o espermatozóide e os leucócitos presentes no sêmen são capazes de gerar ROS e que a susceptibilidade do espermatozóide aos danos oxidativos causados pelos ROS decorrem da alta quantidade de ácidos graxos polinsaturados presentes na sua membrana plasmática. Estes ácidos graxos são altamente predispostos ao ataque dos radicais livres e conseqüentemente, a peroxidação dos lipídios. A acumulação de peróxidos de lipídios na superfície do espermatozóide causa disfunção e morte celular (AITKEN, 1995; ARMSTRONG et al., 1999; KRZYZOSIAK et al., 2000; BAUMBER et al., 2002; BILODEAU et al., 2002).

No presente trabalho, será feito uma breve revisão das características bioquímicas das moléculas de ROS mais comuns, seus efeitos e os diversos sistemas celulares que regulam seus níveis, bem como, o efeito dessas moléculas na função espermática.

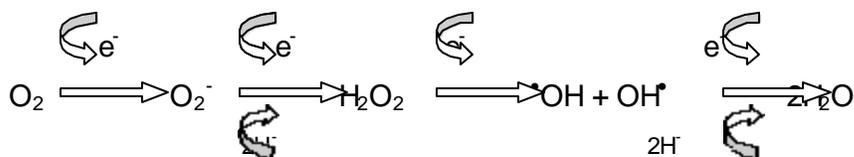
2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Radicais Livres e Espécies Reativas do Metabolismo do Oxigênio

Radical livre é qualquer átomo ou molécula, que contém um ou mais elétrons desemparelhados, ou seja um número ímpar de elétrons, em sua última camada eletrônica (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; NORDBERG & ARNER, 2001) . O elemento oxigênio (O), por definição, pode ser considerado um radical livre, uma vez que possui dois elétrons desemparelhados, cada um localizado em um orbital, na última camada (HALLIWELL & GUTTERIDGE ,1999). Segundo Ferreira & Matsubara (1997) este desemparelhamento de elétrons da última camada, confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas.

Espécies oxigênio reativas (**ROS**) ou espécies reativas do metabolismo do oxigênio (**ERMO**) é um termo coletivo usado no meio científico, que inclui todos os radicais e não radicais derivados do oxigênio (HALLIWELL & GUTTERIDGE ,1999; NORDBERG & ARNER, 2001). Segundo Halliwell & Gutteridge (1999), outro termo popular utilizado para designar as ROS é **oxidante**. Entretanto, para esses autores o termo não é o mais adequado uma vez que algumas ROS (ex. O_2^- e o H_2O_2) podem atuar tanto como agentes oxidantes como redutores, em sistemas diferentes.

As ROS são encontradas em todos os sistemas biológicos. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O (Reação 1). Durante esse processo, são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido (O_2^-), hidroperoxila (HO_2^*) e hidroxila (OH^*) e, o não radical, peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Normalmente, a redução completa do O_2 ocorre na mitocôndria e a reatividade das ROS é neutralizada pela entrada dos quatro elétrons (FERREIRA & MATSUBARA 1997; NORDBERG & ARNER 2001).



Reação 1: Redução do oxigênio molecular (O_2) na mitocôndria, até a formação de água.

Fonte: NORDBERG, J. & ARNER, E.S.J., 2001.

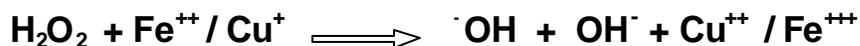
a) *Radical superóxido (O_2^-)*

É um radical livre, formado a partir do oxigênio molecular, pela adição de um elétron. Sua formação ocorre espontaneamente, especialmente, na membrana mitocondrial, através da cadeia respiratória. É também produzido por flavoenzimas, lipoxigenases e cicloxigenases (NORDBERG & ARNÉR, 2001). Sua formação ocorre em quase todas as células aeróbicas e é produzido durante a ativação máxima de neutrófilos, monócitos e eosinófilos (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). É um radical pouco reativo e não tem a habilidade de penetrar membranas lipídicas, agindo, portanto, apenas no compartimento onde é produzido (NORDBERG & ARNÉR, 2001).

b) *Radical hidroxila (OH)*

É considerado o radical livre, mais reativo em sistemas biológicos, sendo capaz de causar mais danos que qualquer outra ROS (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; NORDBERG & ARNÉR, 2001).

É formado a partir do peróxido de hidrogênio em uma reação catalisada por íons metais (Fe^{++} ou Cu^+), denominada reação de Fenton .



Reação 2: Produção de hidroxila a partir de peróxido de hidrogênio (Reação de Fenton)

Segundo Ferreira e Matsubara (1997) se o radical hidroxila for produzido próximo ao DNA e a este estiver fixado um metal, poderão ocorrer modificações de bases purínicas e pirimídicas, levando á mutação ou inativação do DNA. O radical hidroxila também pode iniciar a oxidação dos ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação).

c) *Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)*

O H_2O_2 não é um radical livre, mas, é um metabólito do oxigênio extremamente deletério porque participa como intermediário na reação que produz o

OH (reação 2); tem vida longa e é capaz de atravessar membranas biológicas (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; NORDBERG & ARNÉR, 2001). Uma vez produzido, o H_2O_2 é removido por um dos três sistemas de enzimas antioxidantes: catalase, glutatona peroxidase e peroxireductases (NORDBERG & ARNÉR, 2001).

d) *Óxido nítrico (NO)*

O óxido nítrico é um radical livre, é semelhante ao O_2^- em vários aspectos, como a baixa reatividade com a maioria das biomoléculas. Por outro lado, ele reage facilmente com outros radicais livres (ex. radicais peroxil e alquil), gerando principalmente moléculas menos reativas. O óxido nítrico inibe a peroxidação dos lipídios nas membranas celulares (NORDBERG & ARNÉR, 2001).

2.2. Danos Oxidativos Cusados pelas ROS

Distúrbios no balanço pro oxidante – antioxidante, em favor do oxidante levam a danos celulares, os quais são denominados **danos oxidativos** ou **estresse oxidativo**. O estresse oxidativo pode resultar em adaptação ou injúria celulares. Em princípio o estresse oxidativo pode ser causado por:

1. **Redução na quantidade de antioxidantes** nos sistemas de defesa celular (ex. mutações afetando enzimas de defesa antioxidantes como a Cu-Zn superóxido dismutase (CuZnSOD), MnSOD ou glutatona peroxidase).
2. **Produção elevada de ROS/RNS (espécies nitrogênio reativas)** (ex. exposição a concentrações elevadas de O_2 , a presença de toxinas que são metabolizadas produzindo ROS/RNS ou excessiva ativação dos sistemas naturais de ROS/RNS como a ativação de células fagocitárias em doenças inflamatórias crônicas) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

As ROS podem causar danos a todos os tipos de biomoléculas, incluindo DNA, proteínas e lipídios (peroxidação dos lipídeos). O alvo celular primário pode variar, dependendo na célula, do tipo de estresse imposto e quão severo é esse estresse (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; NORDBERG & ARNÉR, 2001).

a) Peroxidação dos Lipídios

A peroxidação de lipídios é definida como “a deteriorização oxidativa de lipídios polinsaturados”. Ácidos graxos polinsaturados são aqueles que contêm duas ou mais duplas ligações carbono-carbono ($H_2C=CH_2$). Os ácidos graxos polinsaturados são, devido a suas múltiplas duplas ligações, excelentes alvos para o ataque de radicais livres (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; NORDBERG & ARNÉR, 2001).

A membrana que rodeia as células e organelas celulares contém grandes quantidades de ácidos graxos polinsaturados, por isso, ela é um dos componentes celulares mais atingidos pelas ROS em decorrência da peroxidação dos lipídios. Esse processo acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares. Há perda da seletividade iônica, liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos, culminando com a morte celular (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

A peroxidação dos lipídios é uma reação em cadeia que passa pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. A iniciação da peroxidação é causada pelo ataque a um lipídio de qualquer espécie de ROS que tenha reatividade suficiente para seqüestrar um átomo de hidrogênio de um grupo metileno ($-CH_2-$) e o seu término ocorre quando os radicais lipídicos e peroxila ($R-C^*$ e $-ROO^*$) produzidos, propagam-se até destruírem a si próprios. Ácidos graxos com uma ou nenhuma dupla ligação, são mais resistentes ao ataque que os ácidos graxos polinsaturados. O radical hidroxila é reconhecido como a espécie iniciadora da peroxidação (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

2.3. Sistemas Celulares de Defesa Antioxidante

Nos sistemas aeróbicos é essencial o equilíbrio entre agentes óxido-redutores, como as ROS e o sistema de defesa antioxidante. Esses agentes são gerados endogenamente como consequência direta do metabolismo do O_2 . Para proteger-se, do efeito letal da formação excessiva de ROS, a célula possui um sistema de defesa antioxidante, que pode atuar em duas linhas. Uma delas atua como destoxicadora do agente antes que ele cause lesão (glutathione reduzida –

GSH; superóxido dismutase – SOD; catalase, glutathione peroxidase – GPx e vitamina E) e a outra como reparadora da lesão ocorrida (ácido ascórbico, glutathione reductase – GR e GPx). Com exceção da vitamina E (α -tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Segundo Nordberg & Arnér (2001), o sistema antioxidante celular pode ser dividido em sistemas **enzimáticos** e **não enzimáticos**.

2.3.1 - Sistemas enzimáticos

a) *Superóxido dismutase (SOD)*

Foi a primeira enzima metabolizante de ROS, descoberta. Nas células de mamíferos, existem duas formas de SOD: a Cu, Zn-SOD presente no citosol e a Mn-SOD presente na mitocôndria. Estas duas isoenzimas SOD podem metabolizar o O_2^- em peróxido de hidrogênio. Na reação catalisada pela SOD, duas moléculas de superóxido (O_2^-) formam peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular. É, portanto uma fonte de peróxido de hidrogênio celular (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; NORDBERG & ARNÉR, 2001).

Na mitocôndria, o superóxido é formado em concentrações relativamente altas, devido ao escape de elétrons da cadeia respiratória (NORDBERG & ARNÉR, 2001).

b) *Catalase*

A catalase é uma heme proteína citoplasmática que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio a água e oxigênio molecular. É encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado. A catalase também tem função na destoxificação de diferentes substratos, ex. fenóis e alcoóis, via redução acoplada do peróxido de hidrogênio.

Um papel antioxidativo da catalase é diminuir o risco de formação do radical hidroxila a partir do H_2O_2 via reação de Fenton (Reação 2). Para aumentar sua eficiência e protegê-la da inativação, a catalase se liga ao NADPH (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; NORDBERG & ARNÉR, 2001).

c) *Peroxiredoxinas (Prx)*

Peroxiredoxinas ou tioredoxinas peroxidases (TPx), são enzimas recentemente descobertas, capazes reduzir peróxidos diretamente, ex. peróxido de hidrogênio e diferentes alquil hidroperóxidos. A tioredoxina, um componente do sistema alquil hidroperóxido redutase, regenera a Prx oxidada formada em um ciclo catalítico. Na mitocôndria de células de mamíferos, o sistema tioredoxina mitocondrial é provavelmente, um redutor específico de Prx. Têm sido mostrado a participação das peroxiredoxinas na inibição da apoptose celular induzida pelo peróxido de hidrogênio. Até o momento, são conhecidos no mínimo 13 peroxiredoxinas de mamíferos (NORDBERG & ARNÉR, 2001).

d) *Glutathione (GSH)*

A glutathione está presente em todas as células vivas aeróbicas e é o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular. Serve para destoxificar compostos via conjugação em reações catalisadas pela glutathione S-transferase ou diretamente, como é o caso com o peróxido de hidrogênio na reação catalisada pela GPx (NORDBERG & ARNÉR, 2001).

Segundo Ferreira & Matsubara (1997), a GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, protegendo-a da lesão resultante da exposição a agentes como: íons ferro, oxigênio hiperbárico, ozona, radiação e luz ultravioleta. Além disso, participa da destoxificação de agentes químicos e da eliminação de produtos da lipoperoxidação.

e) *Glutathione reductase (GR)*

Após a exposição da GSH ao agente oxidante, ocorre sua oxidação a GSSG (glutathione oxidada ou glutathione dissulfeto). A recuperação da GSH é feita pela enzima GR, uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; NORDBERG & ARNÉR, 2001).

f) *Glutathione peroxidase (GPx)*

A GPx catalisa a redução do peróxido de hidrogênio e de outros peróxidos orgânicos (ex: peróxidos de lipídios na membrana celular) para seus álcoois correspondentes, convertendo GSH a GSSG (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; NORDBERG & ARNÉR, 2001).

Existem quatro tipos diferentes de GPx em mamíferos (GPx1 a 4). Recentemente, foi descoberta que a GPx4 tem dupla função na célula espermática: é enzimaticamente ativa, na espermátide e insolúvel funcionando, como uma proteína estrutural, no espermatozóide maduro. Uma variante da GPx4 diferindo no N-terminal é também, específica do núcleo do espermatozóide onde participa na condensação da cromatina espermática (NORDBERG & ARNÉR, 2001). Segundo Imai & Nakagawa (2003) a GPx4 pode reagir com peróxido de hidrogênio e uma ampla variedade de hidroperóxidos de lipídios sendo, portanto, considerada responsável pela proteção da membrana contra os danos oxidativos.

2.3.2 - Sistemas não enzimáticos

Um grande número de compostos de baixo peso molecular são considerados antioxidantes de importância biológica, incluindo as vitaminas C e E, diferentes compostos de selênio, ubiquinonas (coenzima Q), ácido úrico e ácido lipóico (NORDBERG & ARNÉR, 2001).

a) *Acido Ascórbico (Vitamina C)*

A vitamina C ou ascorbato é uma vitamina hidrosolúvel com ação antioxidante. Ele reduz o α - tocoferol, peróxidos e ROS, como superóxido. Esta vitamina serve principalmente, para prevenir a formação de hidroperóxido de lipídios nas lipoproteínas plasmáticas. Também protege lipídios nas membranas celulares. O ascorbato atua juntamente com GSH para proteger a célula dos danos oxidativos (NORDBERG & ARNÉR, 2001).

Porém, quando em dose elevada ou na presença de metais (ferro ou cobre) a vitamina C pode agir como um pró-oxidante, levando à lipoperoxidação. *In vitro*, tanto a mistura Cu-ascorbato como Fe-ascorbato estimulam os danos oxidativos,

causados por radicais livres, ao DNA, lipídios e proteínas (FERREIRA & MATSUBARA, 1997; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

b) α - Tocoferol (vitamina E)

A vitamina E ou α - tocoferol é uma vitamina lipo solúvel presente nas membranas biológicas. Ela contém um grupo hidroxila através do qual ela rege com elétrons desemparelhados, podendo assim, reduzir radicais peroxil (NORDBERG & ARNÉR, 2001).

Segundo Halliwell & Gutteridge (1999) a vitamina E é provavelmente, o mais importante (mas não o único), inibidor da reação em cadeia da peroxidação de lipídios em animais.

c) Coenzima Q

A coenzima Q exerce sua principal função natural na mitocôndria, como parte da cadeia de transporte de elétrons (cadeia respiratória), mas, esta presente também em baixas concentrações no plasma e membranas celulares onde funciona como um antioxidante, prevenindo a peroxidação dos lipídios (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; NORDBERG & ARNÉR, 2001).

d) Ácido lipóico

O ácido lipóico (ácido 1,2 – ditiolano-3-pentanóico) é um cofator essencial em complexos multi enzimáticos que catalizam a descarboxilação dos α -cetoácidos como o piruvato (a acetil coenzima A - CoA) e α -cetogluturato (a succinil CoA) no ciclo de Krebs.

Ambas as formas: oxidada e reduzida, do ácido lipóico mostram propriedades antioxidativas “*in vitro*” elas reduzem $R-O_2$, HOCl, OH e ONOOH.

Os níveis de ácido lipóico livre nos tecidos e fluídos corporais é muito baixa, o que torna quase impossível que ele exerça efeito antioxidativo “*in vivo*” (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

2.4 - ROS, Antioxidantes e Função Espermática.

Segundo Halliwell & Gutteridge, (1999) a primeira indicação de que o estresse oxidativo pode afetar a viabilidade e função do espermatozóide, foi em 1943, quando MacLeod observou que o espermatozóide humano rapidamente perdia sua motilidade quando incubado a elevadas concentrações de O_2 e que a adição de catalase oferecia alguma proteção.

Os antioxidantes presentes no plasma seminal, normalmente ajudam a protegê-lo dos danos oxidativos, mas, a lavagem do sêmen pode remover esta capacidade protetora, principalmente, se houver contaminação com íons de metais de transição (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999).

A peroxidação dos lipídios parece ser uma causa particularmente, importante de disfunção espermática. Os lipídios da membrana espermática são ricos em ácidos graxos polinsaturados (AGPI). Este alto conteúdo de AGPI dá á membrana plasmática do espermatozóide a fluidez necessária para que ele participe dos eventos de fusão de membranas associados com a fertilização. No espermatozóide peroxidado, a fluidez diminui e a capacidade de fertilização também (AITKEN, 1995).

2.4.1. Geração de ROS no sêmen

Dentro do ejaculado existem duas fontes principais de ROS: o espermatozóide e os leucócitos. Ambos possuem um mecanismo similar de geração de ROS, a nicotinamina adenina dinucleotídio fosfato oxidase (NADPH) localizada na membrana celular. Os leucócitos geram ROS durante a fagocitose e são capazes de gerar 100 vezes mais ROS que as células espermáticas. Por isso, eles representam uma poderosa e potencialmente, perigosa, fonte de ROS e podem ter um efeito prejudicial na função espermática (AITKEN R.J. & CLARKSON J.S. (1987) *apud* BAUMBER et al., 2002).

Baumber et al., (2002) incubaram espermatozóides de garanhão (25×10^6) a 38°C por 30min., com neutrófilos ativados ($0,05 \times 10^6$; 1; 5 e $10 \times 10^6/\text{ml}$) e neutrófilos + catalase (10×10^6 neutrófilos/ml + 200U/ml de catalase) e avaliaram a geração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pelo espermatozóide e pelos neutrófilos ativados, bem como, a influência dos neutrófilos ativados na motilidade espermática.

Aos 30 minutos de incubação houve um aumento significativo ($P < 0,05$) na geração de H_2O_2 com a adição de 5 e 10×10^6 neutrófilos/ml.

Espermatozóides anormais ou não funcionais (ex: de homens inférteis) parecem gerar O_2^- em maiores taxas que aqueles saudáveis. Geração excessiva de ROS no sêmen pode ser uma consequência de infertilidade (AITKEN, 1995). Segundo Zini et al., (2000) o plasma seminal de homens inférteis não é deficiente em SOD e /ou catalase. Portanto, o alto nível de ROS presentes em alguns homens inférteis se deve a produção excessiva de ROS e não a uma deficiência nas defesas antioxidantes.

As espécies oxigênio reativas (ROS) exercem um papel duplo na fertilidade do macho. Por um lado, eles são fundamentais em processos como hiperativação da motilidade, capacitação, reação acrossômica e fertilização. Por outro lado, elas também podem causar severos danos ao espermatozóide, quando os seus mecanismos de defesa estão limitados. Assim, o espermatozóide está continuamente na corda-bamba, porque uma produção controlada de ROS é de vital importância para a sua função normal, enquanto que a superprodução e/ou defesas antioxidantes inadequadas levam a estresse oxidativo, resultando em um impacto negativo na fertilidade (AITKEN, 1995; BLONDIN *et al.* 1997, *apud* OVERVELD *et al.*, 2000).

2.4.2 Sistemas espermáticos de defesa antioxidante

O espermatozóide possui um sistema intracelular de defesa antioxidante contra as ROS, que consiste principalmente, de enzimas como: superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase e redutase, bem como, antioxidantes não enzimáticos como: ácido ascórbico e α -tocoferol (AITKEN, 1995). Extracelularmente ele é protegido pelo plasma seminal que contém vários redutores de ROS enzimáticos e não enzimáticos contribuindo para uma poderosa atividade antioxidante. Estes antioxidantes incluem: ácido ascórbico, ácido úrico, albumina e outras proteínas, catalase, SOD, glutathione e outros tióis, taurina, hipotaurina e vitamina E (OVERVELD *et al.*, 2000; JÓZWIK *et al.*, 1997; ZINI, A *et al.* 2000). Recentemente, Overveld *et al.* (2000), descobriram que a tirosina, também exerce um papel importante como antioxidante no plasma seminal.

Segundo Aitken, (1995) a capacidade biosintética do espermatozóide é limitada, tornando difícil para ele substituir qualquer molécula que tenha sido danificada. Além disso, as enzimas antioxidantes podem estar concentradas na peça intermediária, deixando grande parte da membrana que cobre a cabeça e a cauda menos protegida. Por isso, o plasma seminal é particularmente importante na proteção do espermatozóide contra os danos causados pelos ROS gerados pelo próprio espermatozóide e pelos fagócitos presentes no ejaculado. Overveld et al., (2000) avaliando o potencial antioxidante de cinco compostos presentes no plasma seminal, (ácido ascórbico, ácido úrico, hipotaurina e tirosina (ABTS) e α -tocoferol), observaram um contínuo e relativamente, lento comportamento de captura de radicais. Eles especularam que a relativamente, baixa taxa de reação constante com radicais ABTS exerce um papel crucial no comportamento antioxidante destes compostos. Talvez, uma complexa reação em cadeia pode estar envolvida, incluindo auto regeneração de antioxidantes ou formação de radicais intermediários.

Aurich et al., (1997) avaliaram o efeito da catalase e ácido ascórbico, na motilidade e integridade da membrana do espermatozóide de garanhão, diluído em leite desnatado ou glicina e resfriado a 5°C. A adição de ácido ascórbico resultou em um aumento na porcentagem de espermatozóides com membrana íntegra, nos dois diluidores, enquanto que a catalase não exerceu nenhuma influencia nesse parâmetro, nos dois diluidores. A motilidade também, não foi influenciada pelos dois antioxidantes em qualquer dos diluidores. Ainda no sêmen de garanhões, resfriado a 5°C, Ball et al., (2001), avaliaram o efeito da catalase, BHT¹, Vitamina E, Vitamina C, tempo², trolox³ e BSA⁴ na manutenção da motilidade espermática. Não foi observada nenhuma melhora significativa na motilidade, com a adição desses antioxidantes. Já Baumer et al., (2002) observaram um efeito benéfico da adição de catalase ao diluidor, no sêmen de eqüinos. A catalase reduziu significativamente, (P<0,05) a geração de H₂O₂ pelos neutrófilos ativados e prevenio o declínio no total de espermatozóides móveis. No entanto, não exerceu nenhuma influência no declínio da motilidade progressiva. Os autores concluíram que em garanhões com uma capacidade antioxidante do plasma seminal reduzida ou com alta contaminação por neutrófilos, as defesas antioxidantes podem ser melhoradas com a adição de

¹ Hidroxitolueno Butilatado

² 2,2,6,6-tetrametilpeperidina-1-oxil

³ Análogo hidrosolúvel da vitamina E)

catalase. Por outro lado, as observações clínicas sugerem que, raramente, são observados neutrófilos nestas concentrações ($5 \times 10^6/\text{ml}$) em amostras de sêmen, conseqüentemente, a infiltração normal de neutrófilos parece não possuir um perigo para a função espermática em garanhões.

Krzyzosiak et al., (2000) também observaram um efeito benéfico da adição de catalase ao diluente, na sobrevivência, motilidade e viabilidade do espermatozóide bovino. Bilodeau et al., (2002) observaram que a adição de pequenas quantidades de catalase (1 a 5 U/ml) era suficiente para proteger espermatozóide bovino dos danos causados pelo H_2O_2 à sua motilidade.

Bilodeau et al., (2001) avaliaram o efeito dos tióis: glutatona, cisteína e 2-mercaptoetanol na prevenção da perda de motilidade do espermatozóide bovino, criopreservado em diluidor a base de tris-gema, na presença ou ausência de estresse oxidativo ($100 \mu\text{M}$ de H_2O_2). Todos os tióis, em concentrações acima de $0,5 \text{ mM}$, mantiveram a motilidade espermática alta por seis horas na ausência de fonte externa de H_2O_2 . Entretanto, quando foi adicionado ao diluente $100 \mu\text{M}$ de H_2O_2 , foi necessário 1 mM de cada tiol para proteger efetivamente a motilidade espermática por 6 horas. Concluíram então, que o efeito deletério da criopreservação em tris-gema, na motilidade espermática, pode ser controlado pela adição desses tióis ao diluidor em concentrações de 1 mM .

Foot et al., (2002) avaliaram o efeito da adição de glutatona, superóxido dismutase, ácido ascórbico, hipotaurina, tempo e tempol⁵ ao diluente à base de leite integral e glicerol, na motilidade e fertilidade do espermatozóide bovino. Esses antioxidantes não exerceram nenhum efeito benéfico na motilidade ou na fertilidade, o que foi atribuído à presença de um antioxidante natural abundante no leite, a caseína, que já exerce essa função no diluente estudado.

Trabalhando com sêmen de carneiros na forma líquida, Sarlos et al., (2002) avaliaram o efeito dos antioxidantes: acetato de α -tocoferol, glutatona peroxidase, aromex⁶, resveratrol⁷ e da associação de resveratrol + vitamina E e resveratrol + aromex, na motilidade e integridade das membranas espermáticas. Observaram que a adição de antioxidantes prolonga o período de conservação do sêmen, melhora a motilidade do espermatozóide e reduz o grau de danos celulares. Maxwell &

⁴ Albumina Sérica Bovina

⁵ 4-hidroxi-2,2,6,6-tetrametilpiperidina

⁶ antioxidante sintético

Stojanov (1996) também, observaram efeito semelhante da adição de antioxidantes ao sêmen ovino, diluído em Tris⁸. Eles avaliaram o efeito da adição de catalase, superóxido dismutase, citocromo c e glutathione peroxidase ao diluidor, na viabilidade espermática. Todos os antioxidantes foram hábeis em melhorar tanto a sobrevivência quanto a integridade acrossomal do espermatozóide, durante a estocagem do sêmen na forma líquida. Já Upteri et al., (1997) não observaram nenhum efeito benéfico da adição de antioxidantes (vitamina E, BHA⁹, n-propil galato, Desferal¹⁰ e catalase), ao diluidor, na manutenção da motilidade do espermatozóide de carneiros incubados a 38°C. Atribuem o resultado a um efeito antioxidante do próprio diluente utilizado, que foi o RSD-1(diluyente quimicamente definido para sêmen ovino).

No sêmen ovino congelado com diluente a base de Tris –gema, com e sem glicerol, Sánchez-Partida et al., (1997) avaliaram o efeito de compostos epididimais (taurina, hipotaurina e inositol) e antioxidantes (carnosina e ácido ascórbico) na motilidade e fertilidade do espermatozóide. Somente a taurina exerceu efeito positivo na motilidade espermática, tanto na presença como na ausência de glicerol. No entanto, apesar da melhora na motilidade espermática, a fertilidade do sêmen congelado na presença de taurina (50 mM) não diferiu da observada no sêmen congelado sem taurina. Isso indica, que outros fatores além da motilidade estão envolvidos na capacidade fertilizante e função do espermatozóide criopreservado.

No sêmen de bodes criopreservado, Sinha et al., (1996) observaram um efeito benéfico da adição de glutathione ao diluente a base de Tris. Houve aumento na motilidade e diminuição na porcentagem de anormalidades acrossômicas, no sêmen descongelado. A taxa de fertilidade do sêmen congelado na presença de glutathione, foi maior, mas, não significativamente, que aquela observada para o sêmen congelado apenas em Tris.

2.4.3 – Danos causados ao espermatozóide pelas ROS

A geração de altas concentrações de espécies oxigênio reativas no sêmen, estão associadas com um declínio no metabolismo de energia do espermatozóide,

⁷ 3,4',5-trihidroxi -estilbeno

⁸ Tris (hidroximetil) aminometano

⁹ hidroxianisole butilato

¹⁰ mesilato de deferoxamina

na motilidade e viabilidade espermática e à desnaturação do DNA em cavalos, touros, carneiros, bodes e homens (Baumber et al., 2002; Bilodeau et al., 2002; Krzyzosiak et al., 2000; Armstrong, et al., 1999).

Krzyzosiak et al., (2000) observaram um efeito deletério da exposição ao H_2O_2 na motilidade e viabilidade do espermatozóide bovino durante a incubação a temperatura ambiente por nove dias. Observaram também, um aumento na susceptibilidade à desnaturação *in situ*, do DNA espermático.

Em eqüinos, Baumber et al., (2002) observaram uma influência significativa da geração de ROS na motilidade espermática quando o sêmen foi incubado na presença de 5 e 10×10^6 neutrófilos/ml. Houve um declínio significativo no total de espermatozoides móveis e na motilidade progressiva.

Armstrong et al., (1999) esclareceram que o H_2O_2 é tóxico ao espermatozóide humano e que é responsável pela inibição do movimento espermático e da produção de energia (ATP). Bilodeau et al., (2001) adicionaram 100 μM de H_2O_2 ao sêmen de bovino diluído em Tris-gema e observaram um efeito negativo na motilidade espermática. Em estudo posterior, Bilodeau et al., (2002), observaram que o H_2O_2 foi a ROS responsável pela perda da motilidade do espermatozóide bovino em meio a base de tris, mas não exerceu efeito negativo na viabilidade espermática.

3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

No espermatozóide, a produção excessiva de ROS (estresse oxidativo) leva à disfunção e diminuição da capacidade de fertilização. O papel exercido pelos sistemas de defesa antioxidantes do espermatozóide e do plasma seminal contra os danos oxidativos causados pelas ROS é evidente. No entanto, em condições naturais de acasalamentos o espermatozóide é exposto, principalmente, a condições anaeróbicas, reduzindo assim os potenciais danos causados pelas ROS. Porém, quando o sêmen é manipulado para uso na inseminação artificial ele é exposto ao oxigênio e vários passos do seu processamento podem levar a produção de ROS, bem como a redução das defesas antioxidantes. A lavagem, por exemplo, retira a proteção antioxidante fornecida pelo plasma seminal. Todos esses fatores podem estar contribuindo para aumentar os danos oxidativos ao espermatozóide, observados no sêmen manipulado.

Não há consenso na literatura revisada quanto ao efeito preventivo de vários antioxidantes, adicionados ao diluente, contra os danos oxidativos causados pelas ROS ao espermatozóide. Alguns estudos apresentam efeitos benéficos, enquanto outros não observam nenhum benefício. As divergências nos resultados observados dentro da mesma espécie, certamente, se devem a variações na idade e raça dos animais utilizados, na composição do diluente, forma de conservação do sêmen (líquido, congelado), doses e combinações dos antioxidantes, entre outros. Bem como, às técnicas utilizadas para medir a produção de ROS ou subprodutos do metabolismo enzimático. A padronização dos ensaios utilizados para cada espécie, certamente, possibilitará uma maior uniformidade dos resultados obtidos e a recomendação de quais antioxidantes e em que níveis deverão ser utilizados para uma prevenção adequada.

As propriedades antioxidativas dos diluentes usados rotineiramente para criopreservação do sêmen são pouco conhecidas e o efeito da produção excessiva de ROS nesses diluentes, também não são bem caracterizados. Esse conhecimento é fundamental para que possamos entender como a motilidade espermática seria afetada em determinado diluidor, após o estresse oxidativo resultante da criopreservação. Isso nos ajudaria a formular diluidores melhores, quanto às suas propriedades antioxidativas.

4 – REFERÊNCIAS

AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reprod. Fertil. Devel.**, v. 7, p. 659-668, 1995.

ARMSTRONG, J.S. *et alli*. Characterization of reactive oxygen species induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n.7/8, p. 869-880, 1999.

AURICH, J.E. *et alli*. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. **Theriogenology**, v. 48, p.185-192, 1997.

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

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

BILODEAU, J.F. *et alli*. Thiols prevent H₂O₂ – mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, v. 56, p.275-288, 2001.

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

FERREIRA, A.L.A. e MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e eestresse oxidativo. **Rev. Assoc. Méd. Bras.** V. 43, n.1, p.1-16, 1997.

FOOTE, R.H; BROCKETT, C.C.; KAPROTH, M.T. Motility and fertility of bull sperm in whole milk extender containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v. 71, p. 13-23, 2002.

HALLIWELL, B e GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3ed., Oxford University Press: New York, 1999. 936p.

IMAI, H & NAKAGAWA, Y. Biological significance of phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v.34, n.2, p. 145-169, 2003.

JÓZWIK, M. et al. Nonenzymatic antioxidant activity of human seminal plasma. **Fertility and Sterility**, v.68, n. 1, 1997.

KRZYZOSIAK, J. *et alli*. Changes in susceptibility of bovine sperm to in situ DNA denaturation, during prolonged incubation at ambient temperature under conditions

of exposure to reactive oxygen species and nuclease inhibitor. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.12, p. 251-261, 2000.

MAXWELL, W.M.C.; STOJANOV, T. Liquid storage of ram semen in the absence or presence of some antioxidants. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.8, p. 1013-1020, 1996.

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

SÁNCHEZ-PARTIDA, L.G.; SETCHELL, B.P.; MAXWELL, W.M.C. Epididymal compounds and antioxidants in diluents for the frozen storage of ram spermatozoa. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.9, p. 689-696, 1997.

SARLOS, P. et alli. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. **Acta Veterinaria Hungarica**, v.50, n.2, p.235-245, 2002.

SINHA, M.P. *et alli*. The effect of glutathione on motility, enzyme leakage and fertility of frozen goat semen. **Animal Reproduction Science**, v. 41, p. 237-243, 1996.

UPERTI, G.C. et alli. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v. 48, p. 269-278, 1997.

Van OVERVELD, F.W.P.C.; HAENEN, G.R.M.M.; RHEMREV,J., et al. Tyrosine as important contributor to the antioxidant capacity of seminal plasma. **Chemico-Biological Interactions**, v.127, p. 151-161, 2000.

ZINI, A.; GARRELS, K.; PHANG, D. Antioxidant activity in the semen of fertile and infertile men. **Urology**, v.55, n.6, p. 922-926. 2000.