

## AÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NOS ESPERMATOZOIDES

Endrigo Adonis Braga de Araujo<sup>1</sup>  
Luis Fernando Mercês Chaves Silva<sup>1</sup>  
Sidnei Nunes de Oliveira<sup>1</sup>  
Felipe Morales Dalanezi<sup>1</sup>  
Luiz Roberto Pena de Andrade Junior<sup>1</sup>  
Fabiana Ferreira de Souza<sup>1</sup>  
José Antonio Dell'Aqua Junior<sup>1</sup>  
Frederico Ozanam Papa<sup>1</sup>

### RESUMO

Para que os espermatozoides possam executar suas funções e alcançarem o objetivo final, que é a fecundação, necessitam de energia que advém da adenosina trifosfato (ATP). Durante o metabolismo, a energia é armazenada na forma de elétrons de alta energia que são direcionados a cadeia de transporte de elétrons, composta de cinco proteínas supramoleculares. Neste processo, há a formação de um radical intermediário, o ânion semiquinona ( $Q^-$ ) que eventualmente é capaz de transferir este elétron desemparelhado ao  $O_2$  e formar as espécies reativas de oxigênio, sendo as principais o superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila. Essas moléculas são altamente reativas e nos espermatozoides desencadeiam processos que levam à degradação e decréscimo na qualidade celular. Porém, essas mesmas moléculas que muitas vezes são consideradas grandes vilãs, também participam de mecanismos que culminam na fertilização e formação do zigoto, adquirindo assim uma grande importância. Com o advento da criopreservação de sêmen e o estresse oxidativo associado ao processamento, as espécies reativas de oxigênio entraram em evidência nas pesquisas, tornando-se necessário o estudo de sua ação e maneiras de reduzir o estresse oxidativo.

**Palavras-chave:** células espermáticas, radicais livres, estresse oxidativo.

### ACTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES ON SPERMATOZOA

#### ABSTRACT

So that spermatozoa can perform functions and achieve the goal that is fertilization, require energy from adenosine triphosphate (ATP). During the energy metabolism is stored in the form of high-energy electrons that are directed to the electron transport chain, comprised of five supramolecular protein. In this process, there is the formation of a semiquinone anion ( $Q^-$ ) an intermediate radical that is eventually able to transfer this unpaired electron to  $O_2$  and form reactive oxygen species, as the main superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radical. These molecules are highly reactive and sperm trigger processes that lead to degradation and decrease in cell quality. However these same molecules that are often considered great villains, also participate in mechanisms that culminate in fertilization and zygote formation, thus acquiring great importance. With the advent of semen cryopreservation and oxidative stress associated with the processing, reactive oxygen species entered into evidence in the research, making it necessary to study its action and ways to reduce oxidative stress.

---

<sup>1</sup> Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP/Botucatu/Brasil.

**Keywords:** free radicals, oxidative stress, sperm cells.

## ACCIÓN DE OXÍGENO EN ESPECIES REACTIVAS EN LOS ESPERMATOZOIDES

### RESUMEN

Para que el esperma puede desempeñar sus funciones y lograr el objetivo final, que es la fertilización, requieren energía que proviene de trifosfato de adenosina (ATP). Durante el metabolismo de la energía se almacena en forma de electrones de alta energía que se dirige a la cadena de transporte de electrones, compuesto de cinco proteínas supramoleculares. En este proceso, se produce la formación de una, el anión intermedio radical semiquinona ( $Q^{\cdot-}$ ) que es finalmente capaz de transferir este electrón desapareado a  $O_2$  y formar especies reactivas del oxígeno, la superóxido principal, peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo. Estas moléculas son procesos de activación altamente reactivos y espermatozoides que llevan a la degradación y la disminución de la calidad celular. Sin embargo, estas mismas moléculas que a menudo se consideran grandes villanos, también participan en los mecanismos que culminan en la fertilización y la formación de cigoto, adquiriendo así una gran importancia. Con el advenimiento de la criopreservación del semen y el estrés oxidativo asociado con el procesamiento, especies reactivas de oxígeno entraron en evidencia en la investigación, por lo que es necesario estudiar su acción y formas de reducir el estrés oxidativo.

**Palabras clave:** células de esperma, estrés oxidativo, los radicales libres.

### INTRODUÇÃO

A criopreservação de sêmen se tornou essencial nos programas de reprodução em todo mundo, todavia esses processos imprimem nos espermatozoides uma redução de sua viabilidade e fertilidade devido ao estresse oxidativo, resultado de um desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (ERO) e antioxidantes (1,2), levando a necessidade de conhecimento relacionado à ação das ERO nos espermatozoides e formas de manter seu equilíbrio.

As espécies reativas de oxigênio em altas concentrações são prejudiciais aos espermatozoides, devido a indução de lipoperoxidação, danos ao DNA e apoptose. Por outro lado, em baixas concentrações, desencadeiam eventos de sinalização celular e regulação das funções fisiológicas, como a maturação, capacitação, hiperativação espermática, reação acrossomal e, até mesmo, a singamia (3-5).

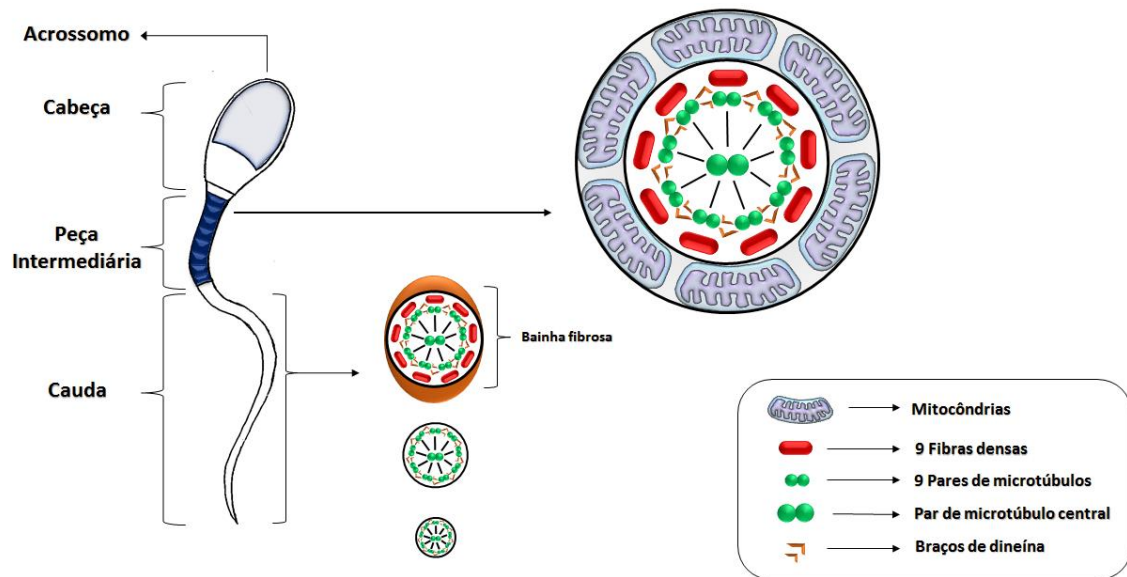
Esta revisão bibliográfica visa atualizar os conhecimentos sobre a ação das espécies reativas de oxigênio nas células espermáticas.

### Espermatozoide

O espermatozoide é dividido morfológicamente em cabeça e cauda (flagelo). A cabeça contém o núcleo, acrossoma e um conjunto reduzido de elementos citosólicos, e se divide em região acrossomal, segmento equatorial e região pós-acrossomal. A cauda pode ser subdividida em peça intermediária, principal e final (6).

Os elementos estruturais principais do flagelo incluem o axonema, as fibras densas exteriores, bainha fibrosa e as mitocôndrias, dispostas de modo helicoidal (Figura 1). O axonema é uma estrutura formada por  $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina disposta num par de microtúbulos centrais rodeado por outros nove periféricos e equidistantes entre si, ligados por braços de dineína (7).

As mitocôndrias se encontram exclusivamente na peça intermediária e são estruturas responsáveis pela produção da maior parte da energia necessária para a movimentação das células espermáticas, tendo como fonte principal de energia a metabolização da glicose (8).



**Figura 1.** Descrição morfológica dos espermatozoides (Autoria: L.F.M.C.SILVA).

A maioria das organelas e citoplasma é removida durante a espermiogênese e trânsito no epidídimo, modificando o espermatozoide a partir de uma célula esférica convencional em uma das células mais especializadas do organismo. Nessa transformação além da remoção ou modificação de organelas (retículo endoplasmático, ribossomos e aparelho de Golgi), ocorre a compactação do DNA e a célula é capaz de se mover (9,10).

A cromatina no interior do núcleo do espermatozoide é altamente condensada, com volume 10% ou menos do que o de uma célula somática. Para adquirir esse nível de compactação, as histonas são substituídas por protaminas e o complexo DNA-protamina é enrolado numa forma helicoidal. Esse modelo fornece proteção adicional contra os efeitos de fatores genotóxicos e confere conformação ideal à célula para executar sua função, facilitando a mobilidade e penetração na zona pelúcida (10,11).

Recobrendo dois terços do núcleo em sua porção apical, localiza-se o acrossoma, estrutura vesicular derivada do complexo de Golgi, envolvida na fertilização (12). Armazena em seu interior enzimas hidrolíticas como acrosina e hialuronidase, dentre outras, essenciais para penetração do espermatozoide no oócito (6,8).

Em relação aos constituintes das membranas celulares, os espermatozoides equinos contêm em média 14% de lipídios, sendo 59,0% de fosfolipídio, 13% de colesterol, 9,0% de diglicerídeos, 8,0% de triglicerídeos e 11,0% de ésteres. Dos lipídeos neutros, o colesterol é o que apresenta maior variação entre espécies e entre ejaculados de um mesmo indivíduo, variando de 13 a 37% dentre todos os lipídeos. A função do colesterol é estabilizar os fosfolipídios, mantendo a membrana em um estado de fluidez compatível com a sobrevivência da célula e execução de sua tarefa (13,14).

### Metabolismo energético

O espermatozoide para desempenhar seu papel de transporte do material genético para dar origem a um novo indivíduo, além de adquirir mobilidade, passa por diversos processos (capacitação, reação acrossomal, singamia) dependentes de trifosfato de adenosina (ATP).

Para isso, os espermatozoides utilizam diversas vias metabólicas para sobreviver sob diferentes fontes de energia, sendo a fosforilação oxidativa a mais significativa. Esta versatilidade é fundamental para garantir o sucesso da fertilização (15).

A glicose é o principal açúcar utilizado pelos espermatozoides equinos, devido a capacidade muito limitada de metabolizar a frutose (7). A glicose ( $C_6H_{12}O_6$ ), por meio de uma série de reações executadas principalmente nas mitocôndrias, é convertida a seis moléculas de dióxido de carbono ( $CO_2$ ), seis moléculas de água ( $H_2O$ ) e 32 moléculas de ATP.

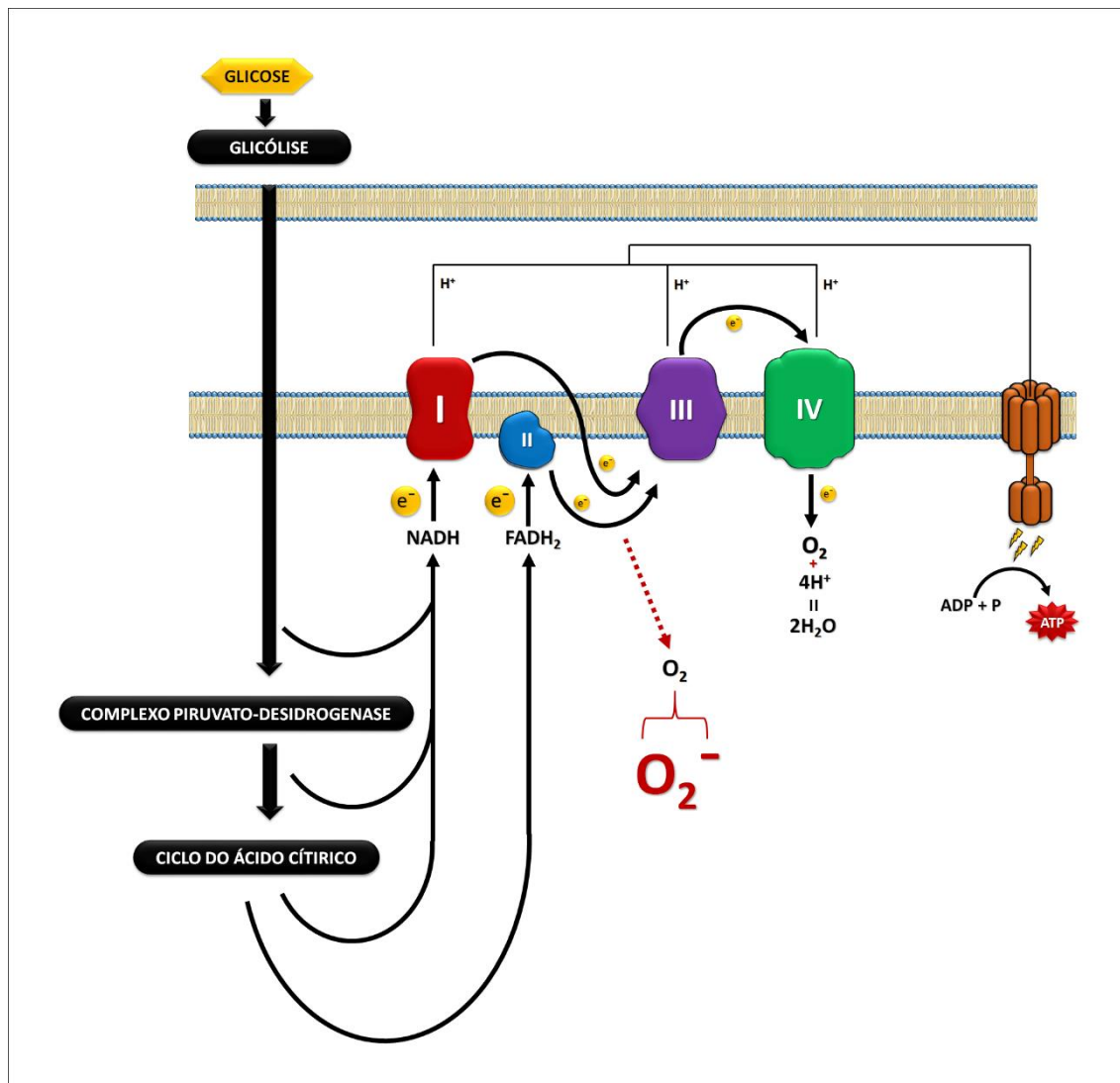
A produção de ATP inicia-se com a glicólise e quase toda a energia disponível pelo consumo de carboidratos, é conservada na forma de elétrons de alta energia removidos dos substratos pela nicotinamida adenina dinucleotídeo ( $NAD^+$ ) e flavina-adenina dinucleotídeo (FAD). A etapa seguinte consiste na oxidação dessas coenzimas reduzidas pela cadeia de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa e a energia é captada para produzir ATP (16).

### **Cadeia transportadora de elétrons e fosforilação oxidativa**

A compreensão do transporte de elétrons e fosforilação oxidativa é de fundamental importância para entender o metabolismo celular e como ocorre a geração de radicais livres, visto que todos os passos oxidativos na degradação de moléculas ricas em energia convergem para esse estágio final da respiração celular, no qual a energia gerada promove a síntese de ATP a partir de difosfato de adenosina (ADP) e fosfato inorgânico. Diversas etapas metabólicas ocorridas nas mitocôndrias podem gerar radicais livres altamente reativos, que podem danificar as células (17).

Os componentes da cadeia transportadora de elétrons estão localizados na membrana interna das mitocôndrias e compõe uma via comum pela qual os elétrons de diferentes combustíveis do organismo fluem para o oxigênio (18). A cadeia respiratória é organizada em cinco complexos supramoleculares (Figura 2), sendo que ao final o oxigênio ( $O_2$ ) é reduzido gerando água ( $H_2O$ ). Os complexos I e II catalisam a transferência de elétrons para a ubiquinona a partir de dois doadores de elétrons diferentes: nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH, complexo I) e succinato (complexo II). O complexo III carrega elétrons da ubiquinona reduzida para o citocromo c, e o complexo IV transfere elétrons do citocromo c para o  $O_2$ . Neste processo, prótons ( $H^+$ ) bombeados para o espaço intermembranar geram um gradiente químico e elétrico que possibilitam o fluxo inverso dos prótons pela ATP sintetase (complexo V) com a resultante formação de ATP (17).

A produção mitocondrial de radicais superóxido ocorre mais frequentemente em dois sítios da cadeia transportadora de elétrons, no complexo I (NADH: coenzima Q redutase) e no complexo III (ubiquinol: citocromo c redutase), sendo este o principal local de produção de ERO (19-21).



**Figura 2.** Descrição dos componentes da cadeia de transporte de elétrons e o trajeto executado pelos elétrons de alta energia durante todo o metabolismo, desde a glicólise até a fosforilação oxidativa, onde será formada a adenosina trifosfato (ATP) (Autoria: L.F.M.C. SILVA).

Pela transferência do par de elétrons, dos NADH e FADH<sub>2</sub> às Q, nos complexos I e II respectivamente, assim como durante a transferência dos elétrons dos QH<sub>2</sub> aos Cit c, no complexo III, há a formação de um radical intermediário, o ânion semiquinona (Q<sup>-</sup>) que eventualmente é capaz de transferir este elétron desemparelhado ao O<sub>2</sub>, levando à formação do radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) (19,20,22-25).

O fluxo de prótons pela membrana interna da mitocôndria é responsável pela formação das moléculas de ATP, isto ocorre devido à diferença de cargas existente entre o espaço interno e externo da membrana, havendo uma tendência de migração passiva dos H<sup>+</sup> do espaço intermembranas em direção à matriz mitocondrial (26). Estes prótons podem adentrar a matriz mitocondrial por dois compartimentos distintos, pela fosfato-translocase ou pela ATP-sintase (27).

A fosfato-translocase permite que um H<sup>+</sup> adentre à matriz mitocondrial carregando consigo um fosfato inorgânico (Pi), que é necessário para que a ADP seja convertida à ATP, já a ATP-sintase é responsável por gerar energia, e esta depende da migração de três H<sup>+</sup> em direção à matriz mitocondrial, portanto são necessárias quatro moléculas de H<sup>+</sup> por ATP gerada (24,27).

## Espécies reativas de oxigênio

As ERO ou radicais livres de oxigênio são quaisquer compostos que contenham um ou mais elétrons não emparelhados. São instáveis e altamente reativos, tendo a capacidade de reagir com um grande número de compostos que estejam próximos, causando uma cascata de reações. Eles podem exercer a função de agentes oxidantes, atuando como receptores de elétrons, ou de agentes redutores, atuando como doadores de elétrons, sendo os três principais tipos de ERO: superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e hidroxila ( $OH^\cdot$ ) (28,29).

### Ânion Superóxido

Gerado pela adição de um elétron principalmente na cadeia respiratória, localizada na membrana mitocondrial, após a primeira redução do oxigênio molecular. O ânion superóxido é pouco reativo e não possui a capacidade de penetração pela membrana lipídica, agindo somente no compartimento onde é produzido. É o produto primário do sistema de formação de ERO, participando da formação do peróxido de hidrogênio pela ação da enzima superóxido dismutase (28,30) (Figura 3).



**Figura 3.** Formação do radical superóxido ( $O_2^-$ ) a partir da incorporação de um elétron livre ao oxigênio ( $O_2$ ) (Autoria: L.F.M.C. SILVA).

### Peróxido de Hidrogênio

Metabólito do oxigênio possui características importantes, mesmo não sendo considerado um radical livre, por não apresentar elétron desemparelhado na última camada. O peróxido de hidrogênio possui vida longa e elevada propriedade de difusão biológica, sendo altamente tóxico para as células (31).

O  $O_2^-$  forma  $H_2O_2$  ao receber um elétron, doado por outra molécula de  $O_2^-$  e dois  $H^+$ , esta reação pode ser espontânea ou catalisada por ação da enzima superóxido dismutase (SOD), presente em quantidades elevadas nas células dos mamíferos. (20,23,32) (Figura 4).

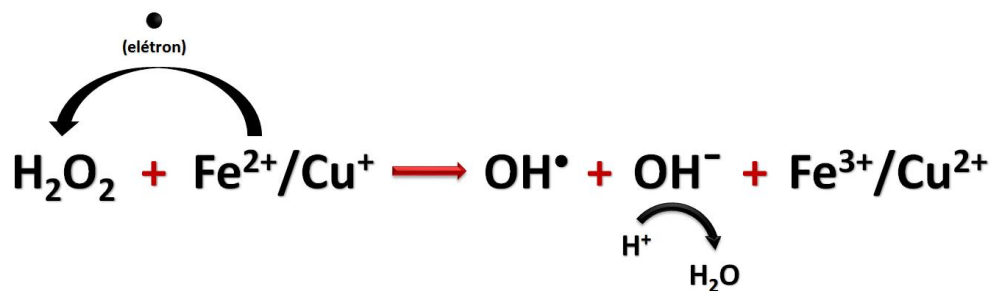


**Figura 4.** Esquematização da formação do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), pela ação da superóxido dismutase (SOD) (Autoria: L.F.M.C. SILVA).

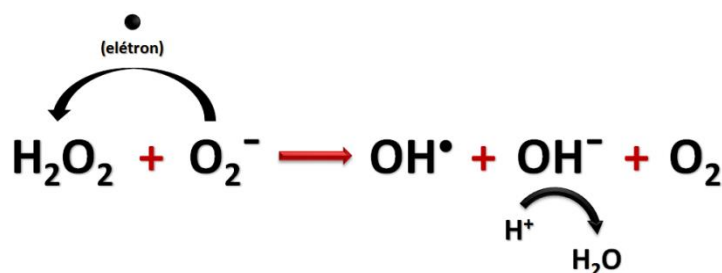
### Radical Hidroxila

Considerada a ERO mais reativa em sistemas biológicos, o radical hidroxila é muito enérgico, possui meia vida curta e capacidade de atravessar membranas, reagindo com moléculas tais como lipídeos insaturados e DNA. Este é formado a partir do  $H_2O_2$  e sua estrutura é composta por um átomo de hidrogênio ligado a um átomo de oxigênio, onde um dos elétrons do  $O_2$  encontra-se desemparelhado (23,33).

Sua formação ocorre a partir da recepção de um elétron por parte do  $H_2O_2$ , podendo ser por reações envolvendo  $H_2O_2$  e o íon férrico ( $Fe^{2+}$ ) ou cobre ( $Cu^+$ ), conhecida por reação de Fenton (20,32,34,35) (Figura 5), ou pela reação entre uma molécula de  $H_2O_2$  e o  $O_2^-$ , conhecida como reação de Haber-Weiss (35,36) (Figura 6).



**Figura 5.** Formação do radical hidroxil ( $\text{OH}^\bullet$ ) pela reação de Fenton (Autoria: L.F.M.C. SILVA).



**Figura 6.** Formação do radical hidroxil ( $\text{OH}^\bullet$ ) pela reação de Haber-Weiss (Autoria: L.F.M.C. SILVA).

### Ação das espécies reativas de oxigênio nos espermatozoides

Os espermatozoides são células produzidas pelos testículos, porém só adquirem competência funcional após passar por processo de maturação pós-testicular, durante o trânsito epididimário. Após a ejaculação, no trajeto pelo trato reprodutivo feminino até o sítio de fertilização, o espermatozoide sofre capacitação, ganhando habilidade de movimento hiperativado e respondendo a sinais que iniciam a sequência de interação celular que culmina na fertilização. Neste percurso, os espermatozoides passam por uma série complexa de transformações que envolvem alterações metabólicas, iônicas e da membrana que são chamadas coletivamente de capacitação (37).

Para o espermatozoide penetrar na zona pelúcida do oócito, é necessário a hiperativação do movimento, que ocorre no local da fertilização; esse é um processo fundamental compreendido na capacitação espermática (38). Já a reação acrossômica é um evento de exocitose, iniciado após a ligação de uma célula espermática à glicoproteína três da zona pelúcida (ZP3) do oócito, no qual enzimas hidrolíticas e proteolíticas (principalmente acrosina e hialuronidase) são liberadas para poder penetrar a zona pelúcida e fundir-se ao oócito. A fusão entre a membrana acrossomal externa e a membrana plasmática na cabeça do espermatozoide ocorre de forma a liberar o conteúdo acrossômico (39).

O primeiro evento na capacitação é o efluxo de colesterol, que está associado com a ativação das vias de transdução de sinais. A membrana plasmática da cabeça do espermatozoide tem quantidades elevadas de colesterol, que regulam a fluidez da membrana (40). O efluxo é promovido mediante carreadores de esterol, como albumina e lipoproteínas de alta densidade presentes no fluido uterino e fluido folicular.

Esse aumento na fluidez da membrana pode incrementar a permeabilidade da membrana para vários íons, tais como cálcio e bicarbonato, que afetam as moléculas de sinalização (41).

O influxo de cálcio e bicarbonato ativam a adenilato-ciclase (AC) para produzir 3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico (AMPC), que ativa a proteína quinase A2 (PKA) para fosforilar, indiretamente, determinadas proteínas em resíduos de tirosina (40). O aumento do



cálcio intracelular é um dos acontecimentos bioquímicos cruciais durante a capacitação e reação acrossomal (42).

O mecanismo exato pelo qual o bicarbonato regula a capacitação não é claro, no entanto, seu influxo tem sido associado a um aumento intracelular do potencial hidrogeniônico (pH), regulação dos níveis de AMPc e hiperpolarização da membrana plasmática (43).

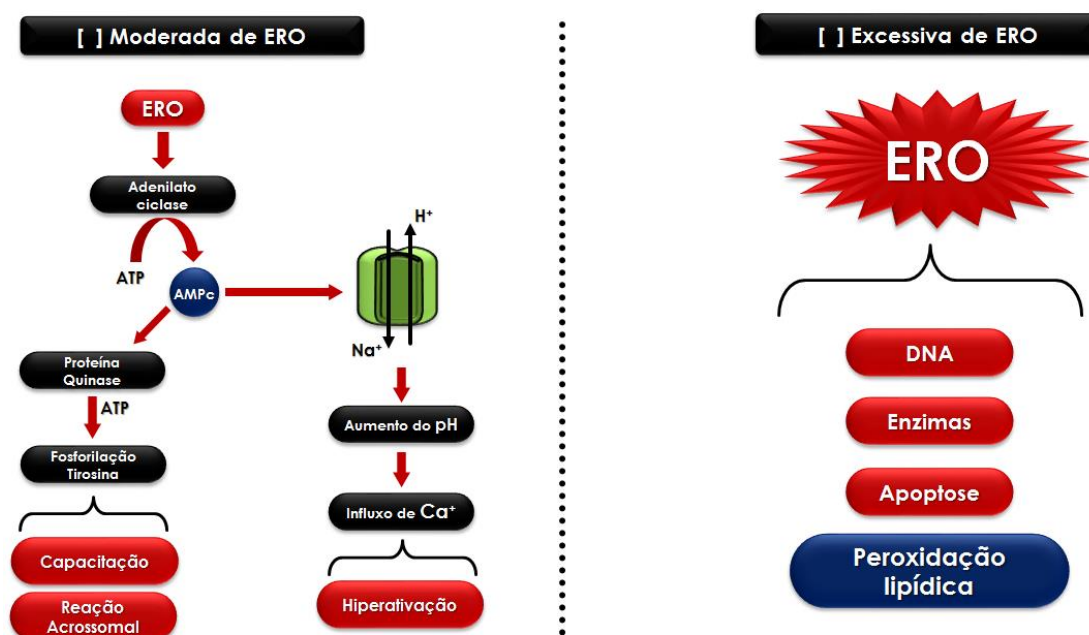
Fosforilação de proteínas, especialmente em resíduos de tirosina, é um dos acontecimentos mais importantes que ocorrem durante a capacitação. A fosforilação é uma modificação que funciona como um dos principais mecanismos de regulação da célula agindo sobre modulação iônica e regulação de receptores, sendo que a adição ou remoção de grupos fosfato pode induzir alterações conformacionais que resultam em ativação ou inativação (44).

Evidências de que ERO estão envolvidas na capacitação espermática e reação acrossomal são demonstradas em experimentos que evidenciaram a inibição da capacitação após a adição de superóxido dismutase (SOD) ao sêmen, o que não ocorre após a adição do ânion superóxido. Além disso, quando adicionado peróxido de hidrogênio ao sêmen, ocorreu reação acrossomal em bovinos (45).

O  $O_2^-$  e o  $H_2O_2$ , em baixas concentrações, são responsáveis por ativar proteínas quinases específicas. Estas enzimas têm a função de catalisar a transferência de grupos fosfatos provenientes de moléculas como o ATP, em direção à tirosina, promovendo fosforilação desta proteína (46-48).

Com isto, Aitken et al. (36), observaram que níveis equilibrados de ERO, são capazes de promover uma desestruturação fisiológica à membrana espermática, levando à adesão do espermatozoide à zona pelúcida do oócito.

Cohen et al. (49) observaram em espermatozoides de ratos in vitro, que o aumento nos níveis de  $H_2O_2$  induziram aumento nos níveis de cálcio intracelular, indicando maior capacidade de fertilizar.



**Figura 7.** Resumo da ação das espécies reativas de oxigênio nos espermatozoides a depender de sua concentração (Autoria: L.F.M.C. SILVA).

Em relação ao desenvolvimento de processos patológicos, as ERO estão relacionadas a causas de infertilidade devido a dois processos principais: danos às membranas espermáticas e dano ao DNA (Figura 7). As membranas possuem grandes quantidades de ácidos graxos poli-

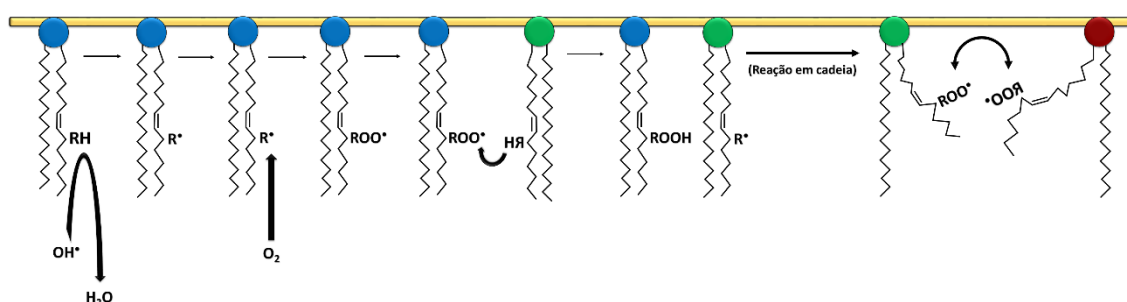


insaturados, tornando os espermatozoides susceptíveis aos efeitos das ERO quando ocorre estresse oxidativo, o que pode afetar a motilidade espermática e sua capacidade em fertilizar os oócitos. Por outro lado, a fragmentação do DNA pode prejudicar a contribuição paterna do material genético para o desenvolvimento do embrião (50).

Esse processo chamado de peroxidação lipídica pode ser definido como a deterioração oxidativa dos lipídios contendo qualquer número de ligações duplas carbono-carbono. Peroxídeos lipídicos são instáveis e decompõem-se para formar uma série complexa de compostos (51). Essa cascata de eventos bioquímicos resultantes da ação das ERO sobre os lipídios insaturados das membranas celulares gera principalmente radical alquil ( $R^\bullet$ ), alcóxil ( $RO^\bullet$ ) e peróxil ( $ROO^\bullet$ ), levando à destruição de sua estrutura, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e à morte celular (52)

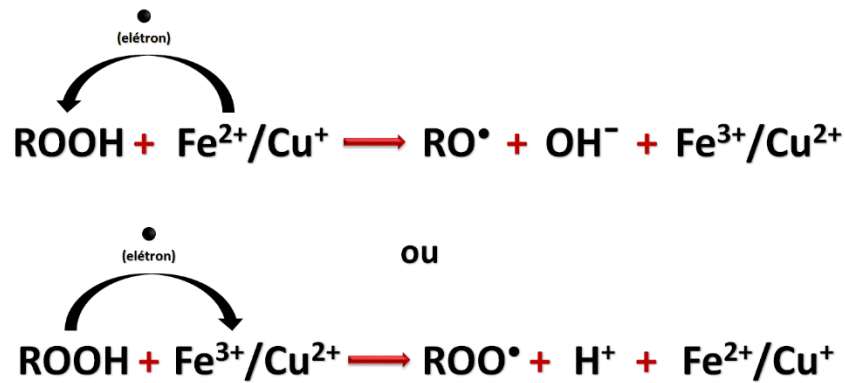
A peroxidação lipídica é determinada por uma sequência de reações desencadeada a partir da ação do  $OH^\bullet$ , que sequestra um  $H^+$  dos ácidos graxos polinsaturados presentes na bicamada fosfolipídica das membranas, se convertendo a  $H_2O$ . Esse processo promove uma desestabilização do ácido graxo formando uma região reativa, com um elétron livre, o radical alquil. Esta região de instabilidade acaba reagindo com uma molécula de  $O_2$  circulante formando os radicais alcóxil ou peróxil, que têm a tendência de buscar estabilidade retirando uma molécula de  $H^+$  e um elétron presentes nos fosfolípídeos adjacentes, levando a formação do hidroperóxido lipídico ( $ROOH$ ). A remoção deste  $H^+$  do ácido graxo vizinho, induz a formação de um novo  $R^\bullet$ , desencadeando uma reação em cadeia. (53,54) (Figura 8).

Se a reação em cadeia não for interrompida haverá a formação de ligações entre os radicais instáveis ( $R^\bullet-R^\bullet$ ,  $R^\bullet-ROO^\bullet$  ou  $ROO^\bullet-ROO^\bullet$ ), que afetam a fluidez, elasticidade e permeabilidade da membrana, fragilizando-a e levando à quebra da estrutura (53,55). Levando à diminuição da motilidade e viabilidade espermáticas (56). Como resultado, a retirada de hidrogênio, evento que inicia a peroxidação lipídica, é promovida, desencadeando uma cascata que, em última análise, conduz à geração de aldeídos eletrofílicos tais como acroleína, 4-hidroxinonenal (4HNE), e de malondialdeído (57).



**Figura8.** Esquematisação da reação em cadeia ocorrida na membrana plasmática durante a peroxidação lipídica.  $H_2O$  (água);  $OH^\bullet$  (radical hidroxil); RH (região estável no ácido graxo);  $R^\bullet$  (radical alquil);  $ROO^\bullet$  (radical peróxil); ROOH (hidroperóxido lipídico) (Autoria: L.F.M.C. SILVA).

De acordo com Halliwell (54), os íons de ferro e cobre, são capazes de reagir com o ROOH, doando ou sequestrando elétrons, desestabilizando a molécula e reiniciando a reação em cadeia (Figura 9).



**Figura9.** Desestabilização do hidropéroxido lipídico (ROOH) por ação dos íons metálicos ( $\text{Fe}^{2+}/\text{Cu}^+$  ou  $\text{Fe}^{3+}/\text{Cu}^{2+}$ ). (Autoria: L.F.M.C. SILVA).

Os altos níveis de  $\text{OH}^\bullet$  circulantes promovem também desestruturação de enzimas importantes, como a succinatodesidrogenase e enzimas do complexo I, comprometendo o funcionamento normal do ciclo do ácido cítrico, levando a inativação do transporte de elétrons e deficiência na produção de ATP, o que reflete em redução na motilidade espermática (20,58,59).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diversas pesquisas vêm sendo realizadas nos últimos anos avaliando-se a influência das espécies reativas de oxigênio nos espermatozoides. Observa-se que, ao mesmo tempo em que as ERO são consideradas vilãs, promovendo decréscimo na qualidade espermática principalmente após criopreservação, elas exercem funções fisiológicas importantes ligadas à fecundação, tornando a busca pelo equilíbrio uma necessidade.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão do auxílio à pesquisa (Processo nº 2014/00175-8).

## REFERÊNCIAS

1. Watson PF. The cause of reduced fertility with cryopreserved sêmen. *Anim Reprod Sci.* 2000;60:481-92.
2. Andrade ER, Melo-Sterza FA, Seneda MM, Alfieri AA. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. *Rev Bras Reprod Anim.* 2010;34:79-85.
3. Lamirande DE, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. Reactive oxygen species and sperm physiology. *J Reprod Fertil.* 1997;2:48-54.
4. Baumber J, Ball BA, Gravance CG, Medina V, Davies-Morel MCG. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. *J Androl.* 2000;21:895-902.
5. Kothari S, Thompson A, Agarwal A, Du Plessis SS. Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian J Exp Biol.* 2010;48:425-435.

6. Varner DDD, Gibb Z, Aitken RJ. Stallion fertility: a focus on the spermatozoon. *Equine Vet J.* 2015;47:16-24.
7. Varner D, Johnson L. From a sperm's view: revisiting our perception of this intriguing cell. *AEEP Proceedings.* 2007;53:104-77.
8. Brito LFC. Evaluation of stallion sperm morphology. *Clin Tech Equine Pract.* 2007;6:249-64.
9. Toshimori K, Ito C. Formation and organization of the mammalian sperm head. *Arch Histol Cytol.* 2003;66:383-96.
10. Miller D, Brinkworth M, Iles D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. *Reproduction.* 2010;139(2):287-301.
11. Braun RE. Packaging paternal chromosomes with protamine. *Nat Genet.* 2001;28:10-2.
12. Hermo L, Pelletier RM, Cyr DG, Smith CE. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 2: changes in spermatid organelles associated with development of spermatozoa. *Microsc Res Tech.* 2010;73:279-319.
13. Komarek RJ, Pickett BW, Gibson EW, Lanz RN. Composition of lipids in stallion semen. *J Reprod Fertil.* 1965;10:337-42.
14. Gadella BM, Rathi R, Brouwers JFHM, Stout TAE, Colenbrander B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. *Anim Reprod Sci.* 2001;68:249-65.
15. Ruiz-Pesini E, Díez-Sánchez C, López-Pérez MJ, Enríquez JA. The role of the mitochondrion in sperm function: is there a place for oxidative phosphorylation or is this a purely glycolytic process? *Curr Top Dev Biol.* 2007;77:3-19.
16. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Biologia molecular da célula.* 5a ed. Porto alegre: Artmed; 2010.
17. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger princípios da bioquímica.* 6a ed. Porto alegre: Artmed; 2014.
18. Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR. *Bioquímica ilustrada.* 3a ed. Porto alegre: Artmed; 2006.
19. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature.* 2000;408:239-47.
20. Raha S, Robinson BH. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci.* 2000;25:502-8.
21. Kussmaul L, Hirst J. The mechanism of superoxide production by NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proc National Acad Sci USA.* 2006;103:7607-12.

22. Herrero A, Barja G. Localization of the site of oxygen radical generation inside the complex I of heart and nonsynaptic brain mammalian mitochondria. [J Bioenerg Biomembranes. 2000;32:609-15.](#)
23. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol.* 2003;552:335-44.
24. Pryde KR, Hirst J. Superoxide is produced by the reduced flavin in mitochondrial complex I: a single, unified mechanism that applies during both forward and reverse electron transfer. *J Biol Chem.* 2011;286:18056-65.
25. Quilan CL, Orr AL, Perevoshchikova IV, Treberg JR, Ackrell BA, Brand MD. Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions. *J Biol Chem.* 2012;287:27255-64.
26. Bertram R, Gram PM, Luciani DS, Sherman A. A simplified model for mitochondrial ATP production. *J Theor Biol.* 2006;243:575-86.
27. Capaldi RA. Arrangement of proteins in the mitochondrial inner membrane. *Biochim Biophys Acta.* 1982;694:292-306.
28. Sikka SC. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr Med Chem.* 2001;8:851-62.
29. Agarwal A, Said TM. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. *BJU Int.* 2005;95:503-7.
30. Nogueira BG, Bitencourt JL, Sampaio BFB, Bender ESC, Costa e Silva EV, Zúccari CESN. Peroxidação lipídica e agentes antioxidantes no sêmen de mamíferos. *Rev Electron Vet.* 2013;15:1-15.
31. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. *Rev Assoc Med Bras.* 1997;43:61-8.
32. Venditti P, Di Stefano L, Di Meo S. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Mitochondrion.* 2013;13:71-82.
33. Pryor WA. Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. *Ann Rev Physiol.* 1986;48:657-67.
34. Liochev SI, Fridovich I. Superoxide and iron: partners in crime. *IUBMB Life.* 1999;48:157-61.
35. Ford WCL. Regulation of sperm function by reactive oxygen species. *Hum Reprod Update.* 2004;10:387-99.
36. Aitken RJ, Clarkson JS, Fisel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod.* 1989;40:183-97.

37. Jonge CD. Biological basis for human capacitation. *Hum Reprod Update*. 2005;11:205-14.
38. Ho HC, Suarez SS. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. *Reproduction*. 2001;122:519-26.
39. Florman HM, Jungnickel MK, Sutton KA. Regulating the acrosome reaction. *Int J Dev Biol*. 2008;52:503-10.
40. Flesch FM, Gadella BM. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1469:197-235.
41. Naz RK, Rajesh PB. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation/ acrosome reaction. *Reprod Biol Endocrinol*. 2004;2:1-12.
42. Florman HM, Corron M, Kim TDH, Babcock D. Activation of voltage-dependent calcium channels of mammalian sperm is required for zona pellucida-induced acrosomal exocytosis. *Dev Biol*. 1992;152:304-14.
43. Nishigaki T, José O, González-Cota AL, Romero F, Treviño CL, Darszon A. Intracellular pH in sperm physiology. *Biochem Biophys Res*. 2014;450:1149-58.
44. Pawson T. Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-sh2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell*. 2004;116:191-203.
45. O'Flaherty CM, Beorlegui NB, Beconi MT. Reactive oxygen species requirements for bovine sperm capacitation and acrosome reaction. *Theriogenology*. 1999;52:289-301.
46. Aitken RJ, Paterson M, Fisher H, Buckingham DW, Van Duin M. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. *J Cell Sci*. 1995;108:2017-25.
47. Leclerc P, De Lamirande E, Gagnon C. Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. *Free Radic Biol Med*. 1997;22:643-56.
48. O'Flaherty C, De Lamirande E, Gagnon C. Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. *Free Radic Biol Med*. 2006;41:528-40.
49. Cohen N, Lubart R, Rubinstein S, Breitbart H. Light irradiation of mouse spermatozoa: stimulation of in vitro fertilization and calcium signals. *Photochem Photobiol*. 1998;68:407-13.
50. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility: a clinical perspective. *Human Reprod Update*. 2008;14:243-58.
51. El-Beltagi HS, Mohamed HI. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and antioxidative defense mechanism. *Not Bot Horti Agrobot Cluj Napoca*. 2013;41:44-57.

52. Repetto MG, Ferrarotti NF, Boveris A. The involvement of transition metal ions on iron-dependent lipid peroxidation. *Arch Toxicol.* 2010;84:255-62.
53. Gardner HW. Oxygen radical chemistry of polyunsaturated fatty acids. *Free Radic Biol Med.* 1989;7:65-86.
54. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration. Where are we now? *J Neurochem.* 2006;97:1634-58.
55. Catala A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38:1482-95.
56. Storey BT. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod.* 1997;3:203-13.
57. Aitken RJ, Lambourne S, Gibb Z. The John Hughes Memorial Lecture: aspects of sperm physiology oxidative stress and the functionality of stallion spermatozoa. *J Equine Vet Sci.* 2014;34:17-27.
58. De Lamirande E, Gagnon C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free Rad Biol Med.* 1993;14:157-66.
59. Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet.* 1995;11:376-81.

**Recebido em: 20/04/2016**

**Aceito em: 24/02/2017**