

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL:
EQUINOS

**BUTAFOSFAN E VITAMINA B12 NO SÊMEN FRESCO E REFRIGERADO
DE GARANHÕES**

NICOLAS CAZALES PENINO

Porto Alegre
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL:
EQUINOS

**BUTAFOSFAN E VITAMINA B12 NO SÊMEN FRESCO E REFRIGERADO
DE GARANHÕES**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Veterinária da UFRGS como requisito para obtenção do grau de Mestre em Medicina Animal: Equinos na área de Reprodução Equina, sob a orientação do Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos.

PORTO ALEGRE
2013

CIP - Catalogação na Publicação

Cazales Penino, Nicolas

Butafosfan e vitamina B12 no sêmen fresco e refrigerado de garanhões / Nicolas Cazales Penino. - 2013.

56 f.

Orientador: Rodrigo Costa Mattos.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Catosal. 2. Antioxidante. 3. Avaliação de Semen . I. Costa Mattos, Rodrigo, orient. II. Título.

NICOLAS CAZALES PENINO

**BUTAFOSFAN E VITAMINA B12 NO SÊMEN FRESCO E REFRIGERADO
DE GARANHÕES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos da Faculdade de Veterinária da UFRGS como requisito para obtenção do grau de Mestre em Medicina Animal: Equinos na área de Reprodução Equina, sob a orientação do Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos.

APROVADO POR:

Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Daniel Cavestany
Membro da Comissão

Prof.^ª Dra. Adriana Pires Neves
Membro da Comissão

Prof. Dr. Ricardo Macedo Gregory
Membro da Comissão

DEDICATÓRIA

“Dedico este trabajo, con mucho amor, a mi abuela Ivonne Stratta quien me introdujo desde una edad muy temprana en el mundo de los caballos”

AGRADECIMENTOS

Quiero agradecer a mis colegas de Posgrado Murilo Farias, Gabriel Santos y Henrique Bastos que sin ellos no hubiese podido llevar a cabo el experimento.

A Verde, Vinicius y Giovani por ayudarme con la versión en portugués de mi tesis, a los estagiarios de REPROLAB por colaborar en los trabajos de limpieza y preparación de materiales para las colectas y evaluación de semen.

A mi orientador Profesor Rodrigo Costa Mattos por darme la oportunidad de trabajar en REPROLAB y poder realizar mis estudios de posgrado aquí en la UFRGS.

A la Universidad de la Republica y CAPES que me dieron la posibilidad de formarme como veterinario y docente.

A mi familia por todo lo que me dieron.

EPIGRAFE

“Ignorar no es nada vergonzante, lo bochornoso es imponer ignorancia”

Daniel Dennet

“La inteligencia no es lo que sabes, sino lo que haces cuando no sabes”

Jean Piaget

“Los hombres lo que realmente quieren no es el conocimiento sino la certidumbre”

Bertrand Russell

Problems of philosophy, Oxford University Press, 1912

RESUMO**Butafosfan e vitamina B12 no sêmen fresco e refrigerado de garanhões**

Autor: Nicolas Cazales Penino
Orientador: Rodrigo Costa Mattos

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da utilização da associação do butafosfan e da vitamina B₁₂ (Catosal B12[®]) na qualidade do sêmen fresco e refrigerado de garanhões. Foram utilizados quatro garanhões divididos aleatoriamente em dois grupos, A e B, cada um com dois garanhões. Um dos grupos serviu como controle e o outro como grupo tratado. Como tratamento utilizaram-se duas aplicações intramusculares de 5 ml /100 kg PV de Catosal por semana. O projeto se dividiu em 4 etapas de 84 dias cada uma. Na primeira etapa o grupo A foi tratado enquanto que o grupo B serviu de controle. Na segunda etapa ambos os grupos deixaram de ser tratados. Na terceira etapa se inverteram os grupos, sendo o B tratado e o A controle. Finalmente na quarta etapa, nenhum dos grupos foi tratado. Imediatamente após a coleta o sêmen foi avaliado e diluído a uma concentração final de 25×10^6 de espermatozoides por mililitro. O sêmen fresco e refrigerado a 5°C foi avaliado quanto a número total de espermatozoides, motilidade total e progressiva, vigor, morfologia, funcionalidade (HOS test) e integridade de membrana (CFDA/PI staining). Foi realizada ANOVA e as médias pelo teste de Tukey. Não se observaram diferenças significativas entre os grupos tratados e os controles em nenhum dos parâmetros espermáticos avaliados tanto no sêmen fresco quanto no sêmen resfriado. Tampouco foram detectadas interações entre os garanhões para nenhum dos parâmetros observados. O uso prolongado de Catosal intramuscular não teve efeitos negativos e pode ser utilizado com segurança, em garanhões destinados á reprodução. O tratamento intramuscular com Catosal nas doses administradas e recomendadas pelo fabricante, durante 84 dias, não alterou a qualidade do sêmen fresco ou refrigerado por 24 horas dos garanhões jovens e férteis.

Palavras-chave: Catosal, antioxidante, avaliação de sêmen.

ABSTRACT***Butaphosphan and vitamin B12 on the quality of fresh and cooled stallion semen***

Author: Nicolas Cazales Penino

Adviser: Rodrigo Costa Mattos

The objective of this study was to evaluate the action of butaphosphan, in combination with vitamin B₁₂ (Catosal B12[®]) on the quality of fresh and cooled stallion semen. Four healthy stallions were randomly assigned to two groups A and B (n=2 per group). One acted as control group and the other one as treatment group. The treatment consisted in two intramuscular applications of 5 ml / 100 kg PV of Catosal per week following the manufacturer's doses recommendations. The project was divided in 4 stages of 84 days. In the first stage group A was treated while group B was the control. After that both groups were not treated allowing a washout period for the treated group. Then, the groups were reversed, group B was treated and group A acted as a control. Finally in the last 84 days both groups were kept without any treatment. Semen was diluted to 25 million sperm/mL and evaluated for total sperm count, total and progressive sperm motility (light microscopy), membrane integrity (CFDA/PI staining) and membrane functionality (HOS test) at 0 and 24 hours after preservation at 5° C. Data were analyzed by one way ANOVA and means compared by the Tukey test at 5% level of significance. Experimental endpoints were analyzed to compare the values for the treated stallions in the period of time between the sixty and eighty-four days of treatment versus the same stallions without treatment. No significant differences between treatment and control groups were detected for any of the sperm parameter evaluated in this study. No interactions between stallions were detected. Results show that the use of Catosal for 84 days in the given doses does not alter fresh and cooled semen quality of the young and fertile stallions.

Key words: Catosal, antioxidant, semen evaluation.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Esquema gráfico das 5 etapas do tratamento.....	39
TABELA 2: Valores das médias, desvio padrão e P do semen fresco durante os 24 dias finais dos períodos tratamento (TR) e controle (CN).....	40
TABELA 3: Valores das médias, desvio padrão e P do sêmen refrigerado por 24 horas a +5°C nos 24 dias finais dos períodos tratamento (TR) e controle (CN).....	40

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Indústria equina	14
2.2 Espermatozoide equino	15
2.3 Sêmen resfriado	19
2.4 Membrana plasmática	21
2.5 Características metabólicas do espermatozoide	23
2.6 Estresse oxidativo	24
2.7 Associação Butafosfan e Vitamina B₁₂	27
2.8 Vitamina B₁₂	30
3 ARTIGO	34
3.1 Introdução	36
3.2 Materiais e Métodos	37
3.3 Resultados	40
3.4 Discussão	41
4 CONCLUSÕES	45
5 REFERÊNCIAS	46

1. INTRODUÇÃO

O agronegócio do cavalo no Brasil é responsável pela geração de aproximadamente 3,2 milhões de empregos, dos quais seiscentos mil diretos, o que representa seis vezes a quantidade gerada pela indústria automotiva, sendo, portanto, uma atividade importante para o País, tanto econômica como social (LIMA et al., 2006). Por muito tempo a espécie equina foi considerada como a de menor fertilidade entre as espécies domésticas, o que foi atribuído a características de seleção e problemas relacionados ao manejo reprodutivo (GINTHER, 1992). Entretanto, a crescente importância individual dos cavalos pela popularização dos esportes equestres tem gerado novos interesses no aperfeiçoamento de tecnologias do sêmen em programas de inseminação artificial, permitindo melhorar o desempenho do garanhão na produção equina (AURICH, 2012). Apesar da melhora em termos de desempenho reprodutivo, através da aplicação de novas tecnologias e técnicas de manejo, geradas a partir da intensa pesquisa nas últimas décadas, alguns gargalos ainda permanecem. As taxas de fertilidade obtidas utilizando sêmen congelado ou resfriado de alguns garanhões permanecem menores que as obtidas com sêmen fresco, variando muito os resultados entre garanhões, desestimulando a sua utilização (LOOMIS, 2001; LOVE, 2012).

Em geral, a origem da subfertilidade dos machos é multifatorial. A já relatada diminuição na qualidade do sêmen equino pode ser resultado de interações de fatores genéticos e ambientais que podem ser facilmente manipulados. Trabalhos realizados em diversas espécies sugerem que a nutrição afeta a espermatogênese e, apesar de ser um fator importante que repercute direta e indiretamente na produção e qualidade espermática, é geralmente ignorada e não considerada para o diagnóstico e tratamento de determinadas afecções reprodutivas. Existe pouca informação sobre a influência de determinados nutrientes na espermatogênese e isso levou, nos últimos anos, ao aumento do interesse na função das vitaminas B e certos minerais como moduladores da fertilidade tanto no homem como nos animais domésticos (BOXMEER et al., 2009).

A principal fonte de vitamina B₁₂ (cianocobalamina) são as proteínas de origem animal e a produção bacteriana no tubo digestivo. Até o momento não existem evidências de deficiências naturais de vitamina B₁₂ e atualmente pouco se sabe sobre os requerimentos mínimos na dieta equina. Baixos níveis plasmáticos de vitamina B₁₂

causam elevação dos níveis sistêmicos de homocisteína (HCY), o que prejudica intensamente o ciclo de remetilação celular. Este ciclo metabólico está envolvido na metilação dos fosfolipídios, das proteínas e na síntese e reparo do DNA, e RNA. Esses processos são essenciais na espermatogênese por isso, muito provavelmente desajustes nessa via metabólica devem prejudicar a função reprodutiva (WONG et al., 2002; BOXMEER et al., 2009; AL-MASKARI et al., 2012).

Recentemente, vários grupos de pesquisadores demonstraram os efeitos adversos de altas concentrações de HCY nos ejaculados e fluidos folicular na posterior qualidade embrionária. Além disso, foi demonstrado cientificamente que a suplementação com ácido fólico e fosfato de zinco aumenta a produção de espermatozoides normais, podendo-se atingir um aumento de até 74% na produção espermática de homens subférteis. Já o efeito das cobalaminas está menos definido, apesar de haver evidências de que a vitamina B₁₂ também melhoraria parâmetros espermáticos. Entretanto, dados sobre a influência de nutrientes específicos na espermatogênese equina ainda são escassos (WATSON, 1962; FURNAS, 1963; BLAIR et al., 1968; WONG et al., 2002; BOXMEER et al., 2009; SCHMID et al., 2012).

A vitamina B₁₂ funciona como uma coenzima em várias funções metabólicas do organismo, incluindo o metabolismo dos lipídios, hidratos de carbono e a síntese proteica. Também resulta indispensável para a regeneração dos tecidos e o crescimento corporal. Sendo a síntese de DNA um passo importante na espermatogênese, a vitamina B₁₂ é de provável importância nesse processo. O fósforo é essencial como cofator de metaloenzimas envolvidas na transcrição de DNA, expressão de receptores de esteroides e síntese proteica. Até hoje se desconhece se as deficiências funcionais de vitamina B₁₂ e fósforo são um fator de risco para fertilidade no macho (SCHMID et al., 2012).

O Catosal B12[®] (Bayer S.A., São Paulo, Brasil) é uma solução injetável indicado como tônico e estimulante metabólico de uso veterinário para prevenção e tratamento de deficiências de vitamina B₁₂ e fósforo em bovinos, equinos, suínos e aves. Cada mililitro de Catosal B12[®] contém 0,05mg de cianocobalamina (vitamina B₁₂) e 100mg de Butafosfan, que equivale a 17,3mg de fósforo orgânico na forma de [1-(n-butil-amino)-1-metiletil]- ácido fosfórico. O Butafosfan e a vitamina B₁₂ modulam várias funções celulares metabólicas, como a oxidação dos ácidos graxos, acetil-CoA e a utilização de piruvato e lactato como substrato energético. Tanto a

vitamina B₁₂ como o fósforo aumentam a atividade de várias enzimas antioxidantes no metabolismo celular, intervêm na replicação celular e do DNA e são muito importantes para a manutenção da estabilidade genética e da homeostasia celular. Apesar de todos estes atributos, até o momento não existem estudos controlados que avaliem os efeitos do Butafosfan e da cobalamina na qualidade seminal dos garanhões (DENIZ et al., 2009; ROLLIN et al., 2010; LOPES et al., 2010; PEREIRA et al., 2012).

Portanto, a suplementação com uma fonte de fósforo orgânico e de vitamina B₁₂, poderia aumentar sua disponibilidade no organismo, não afetando a espermatogênese e podendo melhorar a qualidade seminal dos garanhões subférteis ou senis. O propósito deste estudo foi avaliar o efeito da utilização da associação do butafosfan e da vitamina B₁₂ na qualidade do sêmen fresco e resfriado de garanhões.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Indústria equina

No Brasil o agronegócio do cavalo é responsável pela geração de aproximadamente 3,2 milhões de empregos, dos quais seiscentos mil diretos, o que representa seis vezes a quantidade gerada pela indústria automotiva (LIMA et al., 2006), sendo, portanto, uma atividade importante para o País, tanto econômica como social. A crescente importância individual dos cavalos pela popularidade dos esportes equestres tem gerado novos interesses no aperfeiçoamento de tecnologias do sêmen em programas de inseminação artificial, permitindo melhorar o desempenho do garanhão na produção equina (BROWN & BERTONE, 2002). A inseminação artificial converteu-se em um mercado internacional, sendo a raça PSC a única exceção importante. Criadores de diferentes partes do mundo têm acesso aos melhores garanhões em nível mundial e o número de nascimentos por inseminação artificial tem aumentado de maneira constante, com mais de 90% das éguas de esporte da Europa sendo inseminadas com sêmen fresco, resfriado ou congelado (AURICH, 2012).

A espécie equina foi considerada por muito tempo como a de menor fertilidade entre as espécies domésticas, o que foi atribuído a características de seleção e problemas relacionados ao manejo reprodutivo. O percentual de parição se manteve constante no último século e provavelmente a fertilidade dos equinos vem decrescendo com o decorrer do tempo (MERKT et al., 1979; GINTHER, 1992). Apesar da melhora em termos de desempenho reprodutivo, através da aplicação de novas tecnologias e técnicas de manejo, geradas a partir da intensa pesquisa nas últimas décadas, alguns gargalos ainda permanecem na produção equina e alguns indivíduos requerem uma atenção especial para a obtenção de sucesso reprodutivo. As taxas de fertilidade obtidas utilizando sêmen congelado ou resfriado de alguns garanhões permanecem menores que as obtidas com sêmen fresco, variando muito os resultados entre garanhões, desestimulando a sua utilização (LOOMIS, 2001; LOVE, 2012).

Há relativamente pouco tempo se investiga intensamente como melhorar a qualidade seminal dos garanhões. Algumas pesquisas em andrologia equina vêm demonstrado efeitos benéficos da suplementação oral com ácidos graxos poli-

insaturados (PUFAs) sobre tudo ômega-3 (DHA) no desempenho reprodutivo dos garanhões (HARRIS, 2005; ELHORDOY et al., 2008). Também se demonstrou em distintas espécies que a suplementação oral com antioxidantes melhora a qualidade seminal (AURICH et al., 2008; GEE et al., 2008). Brinsko e colaboradores em 2005 descobriram que a suplementação oral com antioxidantes naturais e DHA, melhoram os parâmetros seminais do sêmen refrigerado e congelado, sobre tudo daqueles garanhões considerados subfêrteis. Em outro estudo realizado em Porto Alegre (Brasil), se melhorou a qualidade espermática, suplementando com óleo de arroz rico em gamma-oryzanol (ARLAS et al., 2008). Paralelamente a estes estudos, clínicos e cientistas têm ampliado seus conhecimentos e conseguiram melhorar a composição dos diluentes comerciais, assim como as técnicas de inseminação e processamento de sêmen. Infelizmente, estes tratamentos vêm obtendo êxitos limitados e apesar de todos esses avanços muitos garanhões continuam produzindo sêmen incapaz de promover uma aceitável viabilidade, motilidade e fertilidade depois de ser submetidos aos rigores do resfriamento e congelamento (BRINSKO et al., 2005; GALLI et al., 2012). Isto faz com que garanhões muito bons tanto para condições morfológicas como esportivas não sejam aptos para ser utilizados em programas de inseminação artificial. Pelo mencionado anteriormente e pelo aumento na importância do uso internacional do sêmen resfriado, é vital melhorar nossos conhecimentos sobre fisiologia espermática e sobre os fatores que afetam a longevidade do sêmen conservado. É necessário continuar pesquisando aqueles aspectos que possam melhorar a qualidade seminal, para poder aumentar a população de garanhões aptos para serem utilizados em programas de inseminação.

2.2 Espermatozoide equino

Os espermatozoides são células altamente especializadas que possuem um núcleo altamente condensado e uma membrana plasmática muito sensível aos danos por resfriamento, especialmente quando sofrem um choque térmico (AMANN & GRAHAM, 1993).

Para que ocorra a fertilização, o espermatozoide deve desenvolver e manter, pelo menos, sete atributos gerais: a) metabolismo para produção de energia; b) motilidade progressiva; c) integridade do DNA; d) enzimas localizadas no acrossoma (integridade acrosomal); e) composição e distribuição apropriada de lipídios e

proteínas nas membranas de forma a estabilizar essas estruturas e permitir o correto funcionamento até a fertilização; f) apresentar proteínas na membrana plasmática que são essenciais para a sobrevivência do espermatozoide no trato genital feminino, pela ação supressora da imunidade, bem como pelas interações necessárias com células epiteliais em locais determinados e pelo acoplamento do espermatozoide a membrana do ovócito no momento da fertilização; e g) ter capacidade de responder aos agentes capacitantes (AMANN & PICKETT, 1987; AMANN & GRAHAM, 2011).

O espermatozoide é composto por cabeça, colo, peça intermediária, peça principal e peça final, sendo todas estas estruturas envoltas por uma membrana plasmática. A cabeça contém um núcleo com DNA altamente condensado, com o material genético que será transferido para o óvulo e está revestida apenas por uma delgada capa de citoplasma e pela membrana celular em torno da sua superfície. Na parte externa dos dois terços anteriores da cabeça esta o acrossoma que contém enzimas hidrolíticas necessárias para a penetração durante a fertilização (AMANN & GRAHAM, 1993). A cauda é composta por uma região chamada de colo, pela peça intermediária, que contém elos de mitocôndrias que são o motor do espermatozoide, pela peça principal, que contém bainhas fibrosas, e pela peça final, que contém microtúbulos (AMANN & GRAHAM, 1993). O movimento rotacional com chicote da cauda (movimento flagelar) determina a motilidade do espermatozoide. Este movimento é o resultado de um movimento rítmico de deslizamento longitudinal entre os túbulos anteriores e posteriores que constituem o axonema. A energia necessária para este processo provém do trifosfato de adenosina (ATP) sintetizado pelas mitocôndrias da peça intermediária. Os espermatozoides normais se movem a uma velocidade de 1 a 4 mm/minuto, o que lhes permite deslocar-se através do aparato genital feminino em busca do ovulo (VARNER & JOHNSON, 2011).

Sabe-se que durante a passagem do espermatozoide pelo epidídimo a superfície deste é remodelada mediante uma mudança e incorporação de proteínas e lipídios por um mecanismo que ainda é desconhecido (maturação espermática) (SULLIVAN et al., 2007). Vários estudos demonstram que a glicerilfosforilcolina, produzida no epidídimo, tem papel importante no metabolismo dos lipídios e parece ser chave na maturação dos espermatozoides (MANN, 1964).

Logo após a ejaculação, os espermatozoides maduros devem sofrer uma série de mudanças estruturais e metabólicas antes de adquirir a habilidade de se unir a zona pelúcida e fertilizar o ovócito. Estas mudanças são conhecidas coletivamente como

processo de capacitação, o que normalmente ocorre dentro do trato genital da égua. O aspecto mais importante da capacitação são as mudanças que permitem ao espermatozoide reconhecer a zona pelúcida e desencadear a reação acrosomal em resposta à união com esta. Estas mudanças incluem facilitar a entrada do Ca^{++} na célula, aumentando o Ca^{++} e os níveis de AMPc intracelular, aumentando a fluidez da membrana permitindo uma reorganização estrutural das lipoproteínas e mudanças na atividade metabólica para adquirir uma hipermotilidade e permitir o mais rápido possível alcançar e penetrar o ovócito. Este processo parece ser uma seleção natural dos melhores espermatozoides, que serão os que fertilizarão finalmente o óvulo. Um dos primeiros sinais de capacitação é a aquisição de hipermotilidade e esta parece ser desencadeada pela fosforilação dos resíduos (serina e treonina) de determinadas proteínas espermáticas. Esta fosforilação é resultado da ativação da adenilato ciclase e da proteína cinase A. Ambas as enzimas parecem ser imprescindíveis no processo de capacitação espermática (VARNER & JOHNSON, 2011).

Esta reorientação e modificação das moléculas estruturais ocorrem uma vez que os espermatozoides são ativados por meio dos fatores de capacitação e são requisitos para poder se unir e penetrar a matriz extracelular do oócito (GADELLA & VAN GESTEL, 2004). Parte das proteínas que recobrem a superfície dos espermatozoides vão se perdendo durante o trajeto pelo trato reprodutivo feminino, enquanto outras se incorporam a membrana plasmática (SUAREZ, 2006). Quando o espermatozoide se encontra junto ao oócito no oviduto ou durante a fertilização *in vitro* (IVF), a porção apical da cabeça espermática contém complexos proteicos funcionais capazes de reconhecer-se e unir à zona pelúcida (VAN GESTEL et al., 2005). Esta união induz a reação acrossomal que lhe permite liberar as enzimas necessárias para penetrar a zona pelúcida e entrar em contato direto com o oolema (membrana plasmática do oócito). Neste momento outro conjunto particular de proteínas superficiais se encontra na região equatorial da cabeça do espermatozoide e são as responsáveis por aderir e fundir os dois gametas e induzir a fertilização (VJUGINA & EVANS, 2008). Todas estas etapas se caracterizam por uma específica reorganização das moléculas que constituem a membrana plasmática.

O envelhecimento celular resulta em capacidade de fertilização reduzida, diminuição da motilidade espermática e aumento da mortalidade embrionária (AMANN & GRAHAM, 1993). A perda da fertilidade dos espermatozoides senis é provavelmente causada por sua incapacidade de iniciar a fertilização, devido a

alterações morfológicas e distúrbios na motilidade, capacitação, reação acrossômica, enzimas acrossômicas, capacidade de acoplamento ou a anormalidades genômicas (AMANN & GRAHAM, 1993). As alterações físico-químicas que ocorrem durante o armazenamento *in vitro* e *in útero* são, em sua maioria, irreversíveis (VARNER & JOHNSON, 2011). Os defeitos dos espermatozoides induzidos pelo envelhecimento podem ser classificados em: 1) nucleares; 2) de membrana; 3) perda de componentes intracelulares (enzimas, íons e metabólitos); e 4) peroxidação dos lipídios (AMANN & GRAHAM, 1993). A peroxidação de lipídios e a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) são as causas principais de defeito de membrana e DNA nuclear encontrados em os espermatozoides envelhecidos e resultam da interação do oxigênio com os ácidos graxos insaturados (AMANN & GRAHAM, 1993; PEÑA et al., 2012). Os peróxidos lipídicos resultantes afetam as membranas, alterando sua permeabilidade e induzindo o rompimento (MANN & LUTWARK-MANN, 1975; BALL, 2008). A permeabilidade destas membranas aumenta, permitindo o vazamento de constituintes intracelulares e a porcentagem de espermatozoide com movimentos progressivos diminui linearmente à medida que a peroxidação aumenta (ALVAREZ & STOREY, 1983).

A estrutura celular dos espermatozoides os faz extremamente suscetível aos ROS. A membrana plasmática é rica em ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) sendo estes facilmente peroxidados na presença de ROS, provocando mudanças na fluidez da membrana (ALVARES & STOREY, 1982), e levando a uma redução na fertilidade. Os espermatozoides equinos geram ROS que em quantidades fisiológicas têm um efeito positivo, facilitando a reação acrosomal requisito imprescindível para a fertilização do oócito. Contudo, quando se produz um desequilíbrio entre os mecanismos de produção e degradação dos ROS, aumentando perigosamente os níveis destes, é quando ocorre o dano das membranas por peroxidação lipídica, descondensação e fragmentação do DNA e desnaturação das proteínas espermáticas (KANKOFER et al., 2005).

2.3 Sêmen refrigerado

A inseminação artificial é uma técnica bastante difundida e comum em reprodução equina. Há relatos de inseminação artificial com sêmen fresco em textos árabes do século XIV, sendo que sua popularização ocorreu a partir do final do século XIX (BRINSKO & VARNER, 1992). A inseminação artificial (IA) com sêmen refrigerado vem sendo usada de maneira rotineira na indústria equina por mais de 25 anos. Hoje em dia a maioria dos registros oficiais das diferentes raças equinas aprova seu uso e os criadores vêm sendo amplamente beneficiados por esta biotecnologia (AURICH & AURICH, 2006). Contudo, apesar de todos os avanços biotecnológicos uma variedade de problemas ainda existe. Um dos principais é a grande variabilidade que existe entre garanhões, sendo que nem todos são aptos para serem usados na produção de sêmen refrigerado devido a sua baixa fertilidade. Isto parece estar relacionado principalmente à composição do plasma seminal (PS) e da membrana plasmática do espermatozoide. Apesar do desenvolvimento de novos diluentes e de técnicas de seleção espermática ainda não se conseguiu prolongar o tempo de armazenamento por mais de 24-48h sem comprometer a fertilidade, assim como não se conseguiu melhorar a fertilidade daqueles garanhões considerados “maus resfriadores” ou “maus congeladores” (BRINSKO et al., 2000; KARESKOSKI & KATILA, 2008).

Um dos principais fatores que afetam a longevidade dos espermatozoides refrigerados é o garanhão em si. Os garanhões são classificados em “bons e maus resfriadores” baseado na qualidade do sêmen pós-resfriado (BRINSKO et al., 2000). Isto não só depende da qualidade do sêmen nativo com também da composição do plasma seminal e da membrana plasmática do espermatozoide. O sêmen de alguns garanhões não pode ser resfriado devido a sua grande sensibilidade ao choque térmico, e só podem ser usados para IA com sêmen fresco. Isto reduz a maioria dos benefícios da IA para um número considerável de garanhões que são importantes por seu valor genético (WATSON, 2000).

Obviamente as causas de uma reduzida fertilidade com sêmen refrigerado de determinados garanhões pode ser multifatorial, indo desde um mau manejo das éguas a problemas intrínsecos do sêmen e maior susceptibilidade destes ao choque térmico. Alguns garanhões aparentemente mantêm uma adequada longevidade da motilidade espermática, contudo, a fertilidade é menor que a esperada. Isto sugere que outras

regiões estruturais do espermatozoide não relacionadas com a motilidade estão comprometidas quando os espermatozoides são refrigerados e armazenados a +5°C. Isto explicaria porque os espermatozoides ejaculados com boa motilidade e vigor não fertilizam ou têm taxas de prenhez mais baixas do que o esperado. Dentro das regiões que podem estar afetadas e que não envolvem a motilidade temos aquelas relacionadas ao processo de capacitação, integridade acrosomal e o DNA nuclear (LOVE, 2005; LOVE et al., 2005).

Depois de 24 e 48 h de armazenamento refrigerado a +5°C a completa ou parcial remoção do plasma seminal demonstrou um efeito protetor para a integridade do DNA espermático. O dano ao DNA aumenta à medida que os níveis de plasma seminal e o tempo de armazenamento aumentam, sugerindo que o plasma seminal contém fatores que danificam o DNA espermático (LOVE et al., 2005). O dano ao DNA espermático se deve ao estresse oxidativo, produto da peroxidação dos lipídios da membrana plasmática. É maior em animais e homens subférteis ou senis se os compara com os férteis e jovens sugerindo que há uma maior susceptibilidade ao dano oxidativo e instabilidade do DNA nestes animais. Love et al. (2002) demonstraram que os garanhões com fertilidade reduzida também tinham uma acelerada redução da integridade de seu DNA logo após ser refrigerado a +5°C se comparados com garanhões férteis. Isto também foi demonstrado no touro onde se viu uma importante redução da integridade do DNA devido ao estresse oxidativo produto do armazenamento por tempo prolongado (BALL, 2008).

Os espermatozoides são capazes de produzir ROS, componentes que causam perda na qualidade espermática e também possuem enzimas proteolíticas endógenas que provocam dano nuclear e de membrana plasmática. Devido ao fato dos espermatozoides perderem a maioria de seu citoplasma durante a espermatogênese, têm uma defesa limitada contra o estresse oxidativo e são altamente dependentes dos antioxidantes fornecidos pelos fluidos testiculares, epididimários e pelo plasma seminal, não tendo nenhuma capacidade de reparação (LOVE et al., 2005).

Um estudo realizado por Love et al. (2005) demonstrou que existe uma redução na integridade do DNA no sêmen refrigerado por 24hrs apesar de manter a motilidade espermática. O plasma seminal dos garanhões se caracteriza por possuir altas concentrações de sódio comparado com outras espécies. Isto provoca uma espontânea peroxidação lipídica da membrana que vai desestabilizar a cromatina afetando o DNA nuclear se o sêmen é refrigerado por períodos prolongados de tempo

(24 ou 48hrs). Isto indica que o espermatozoide do garanhão é altamente suscetível à peroxidação lipídica quando é refrigerado, devido à composição de seu plasma seminal, da membrana plasmática e de sua dieta (HARRIS et al., 2005; BRINSKO et al., 2005; ELHORDOY et al., 2008).

2.4 Membrana plasmática

A membrana plasmática envolve todo o espermatozoide e é composta por três camadas: a dupla camada lipídica, a interfase fosfolipídio-água e o glicocálix. A dupla camada lipídica é composta de fosfolipídios polares, colesterol e proteínas. A proporção de colesterol, fosfolipídios, assim como a natureza dos fosfolipídios, determina a fluidez da membrana plasmática (AMANN & GRAHAM, 1993). Em geral quanto maior for a quantidade de colesterol, menos fluida e flexível será aquela porção da membrana. A fluidez é fundamental nos eventos que requerem fusão de membrana, como na reação acrosomal e fertilização (GLIBERT & FALES, 1996). A membrana plasmática encontra-se fluida à temperatura corporal e os tipos de fosfolipídios que compõem a membrana e a quantidade de colesterol presente influenciam na resposta de toda a estrutura membranosa ao resfriamento (HAMMERSTEDT & GRAHAM, 1992; HAMMERSTEDT et al., 1990).

As proteínas estão intercaladas com os lipídios e representam 50% do peso da membrana. As proteínas são consideradas integrais (essenciais para a estrutura da membrana) ou periféricas (facilmente removíveis). Algumas das proteínas estruturais servem como poros ou canais através da membrana para a passagem de determinadas moléculas, enquanto outras se localizam entre a bicamada lipídica e são importantes para manter a estrutura da membrana (AMANN & GRAHAM, 1993).

Limitada informação existe até o momento sobre a composição da membrana plasmática do espermatozoide equino. Sabe-se que a relação colesterol/fosfolipídios é de 0,36 nos garanhões, ficando na metade do caminho entre os valores encontrados no touro e no porco. Como nos espermatozoides de outras espécies domésticas os principais fosfolipídios encontrados como constituintes de membrana são colina, etanolamina e esfingomiéline. A composição e localização destes fosfolipídios e das proteínas variam segundo a região da membrana plasmática. Isto se deve às diferentes funções que têm a membrana plasmática nas diferentes regiões do espermatozoide (GADELLA, 2008).

Muitas das proteínas de superfície contêm carboidratos com carga negativa que sobressaem à superfície da membrana e são encarregadas de atrair e se unir a proteínas soltas no meio. De acordo com esta capacidade de absorver diferentes tipos de moléculas e aderi-las à membrana, é que o aspecto exterior do glicocálix pode mudar, dependendo do meio em que se encontra (GADELLA, 2008).

As membranas plasmáticas dos espermatozoides contém grande concentração de PUFA's de cadeia longa (C22). Devido a isto e a inadequados mecanismos de defesa é que os espermatozoides são altamente suscetíveis à peroxidação lipídica (JONES & MANN, 1973; BALL, 2008). A produção excessiva de ROS provoca efeitos adversos na função espermática e integridade de membrana (BAUMBER et al., 2000). O estresse oxidativo consequente de uma alta produção e escassa degradação dos ROS resulta em uma diminuição dos níveis intracelulares de ATP os quais iniciam a peroxidação lipídica da membrana plasmática (ALMEIDA & BALL, 2005). Para evitar esta superprodução de ROS os espermatozoides desenvolvem mecanismos de defesa, que incluem um sistema enzimático e outro não enzimático. As enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathione transferase e glutathione peroxidase participam do sistema antioxidante enzimático, enquanto que ascorbato, glutathione reduzida, urato, vitamina E, Vitamina C e beta-caroteno pertencem ao sistema não enzimático (BALL, 2011). O resfriamento e o congelamento do sêmen para seu posterior uso em planos de inseminação artificial aumenta a produção de ROS e provoca dano celular associado com uma desestabilização dos lipídios que compõem a membrana plasmática do espermatozoide, dano mitocondrial e perda da integridade da membrana plasmática e acrosomal (PARKS, 1992; PEÑA et al., 2012). Estes eventos são acompanhados pela perda da motilidade, viabilidade e fertilidade, fenômenos todos associados ao choque térmico e a trocas bruscas na temperatura (WATSON, 2000; PEÑA et al., 2012). A diferença entre a resistência dos espermatozoides dos diferentes ganhões para resistir ao choque térmico esta na composição lipídica da membrana plasmática e acrosomal e a sua capacidade metabólica (enzimática) e antioxidante (BRINSKO et al., 2005; HARRIS, 2005). Isto explicaria as diferenças encontradas entre raças e entre indivíduos de uma mesma raça na capacidade de manter uma qualidade seminal ótima após os processos de resfriamento e congelamento.

2.5 Características metabólicas do espermatozoide

Os espermatozoides possuem capacidade limitada de biossíntese e reparação celular. Muitos componentes necessários para a função e o metabolismo do espermatozoide são sintetizados durante a espermatogênese e, para que estes mantenham suas funções e produzam energia, é necessário que este inicie os processos catabólicos como a glicólise, para assim poder manter a motilidade, o equilíbrio iônico e as diversas funções celulares (INSKEEP et al., 1985).

Para obter energia, o espermatozoide depende em 90% de substratos extracelulares, principalmente carboidratos (AMANN & GRAHAM, 1993). Em várias espécies, os espermatozoides metabolizam rapidamente monossacarídeos, como glicose e frutose, mas não metabolizam outros açúcares ou carboidratos mais complexos (MANN, 1964). Os espermatozoides equinos, no entanto, possuem capacidade limitada para o uso da frutose, quando comparados com os espermatozoides de outras espécies, e não são capazes de metabolizar o sorbitol, um importante componente do plasma seminal equino. Outros substratos utilizados pelo espermatozoide incluem o ácido lático, o glicerol, ácidos graxos e aminoácidos. Portanto a glicose se torna a principal fonte de energia para o espermatozoide equino (MANN, 1964). Os açúcares são transportados através da membrana plasmática pelo transporte específico das proteínas sendo metabolizados intracelularmente para a liberação de energia (MANN, 1964). Componentes do metabolismo endógeno contribuem em 10% para a energia celular e produção de ATP em estado fisiológico (HAMMERSTEDT & LOVRIEN, 1983).

Vários íons afetam a motilidade e a respiração espermática. Componentes que estimulam o espermatozoide incluem PO_4^- e $\text{Na}_2\text{HCO}_3^-$ e baixas concentrações de K^+ ou Mg^{++} e os íons que inibem a motilidade e o metabolismo incluem H^+ , Mn^{++} , Ca^{++} e altas concentrações de Mg^{++} (MANN, 1964; VIJAYARAGHAVAN & HOSKINS, 1986). Uma das consequências do metabolismo aeróbico é a produção de peróxido de hidrogênio nas mitocôndrias, o qual se torna tóxico para a célula espermática e potencializa a peroxidação de lipídios na membrana plasmática, gerando ROS, danificando sua estrutura, diminuindo a motilidade e a viabilidade do espermatozoide (ALVAREZ & STOREY, 1984).

A peroxidação de lipídios causa disfunção de certas enzimas metabólicas, aumentando a permeabilidade da membrana plasmática, danificando sua estrutura,

diminuindo a motilidade e a viabilidade do espermatozoide. O metabolismo aeróbico do espermatozoide esgota o oxigênio dissolvido no diluente ou no plasma seminal, forçando o mesmo a realizar um metabolismo anaeróbico, que tem como produto final o ácido láctico (MANN, 1964). Isto ocorre, por exemplo, quando o sêmen é resfriado a baixas temperaturas, como +5°C. Este acúmulo de ácido láctico, por sua vez, reduz o pH do meio, diminuindo mais o metabolismo e a produção de ATP, acarretando queda da motilidade espermática, perda da integridade do DNA e da membrana. Por isto é muito importante que o espermatozoide possa manter o pH intracelular, para poder manter a motilidade e o metabolismo espermático (AMANN & GRAHAM, 1993).

2.6 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é um componente importante da citopatologia do espermatozoide equino refrigerado ou congelado. Danos na cromatina, membranas, e proteínas são importantes componentes deste dano. O número de mudanças a que é submetido o espermatozoide durante seu processamento e armazenamento também induz as mudanças celulares apoptóticas os quais afetarão negativamente a sobrevivência e a funcionalidade dos espermatozoides (BALL, 2011).

As membranas plasmáticas dos espermatozoides dos mamíferos se caracterizam por ter uma concentração relativamente alta de PUFAs, a qual os faz extremamente susceptíveis ao dano peroxidativo. Uma vez iniciada a peroxidação lipídica, produz-se uma reação em cadeia com a formação de peróxidos lipídicos e citotocinas (aldeídos) como o malondialdeído e o 4-hidroxinonenol. Esta peroxidação lipídica produz danos ao DNA, e altera a fluidez da membrana, a qual afeta suas funções, como sua habilidade para fusionar-se durante a exostose acrossomal importante para a liberação das enzimas necessárias para a penetração da zona pelúcida do oócito (BALL, 2011).

Em condições patológicas do sêmen, foi constatado um desequilíbrio oxidativo, que resulta em subfertilidade e infertilidade. No sêmen de pacientes com infertilidade idiopática, infecções genitais, varicocele, teratozoospermia, astenozoospermia e azoospermia foi demonstrado um aumento na produção de ROS e uma redução das defensas antioxidantes (AGARWAL & SAID, 2005). Fato que

também ocorre durante o processamento do sêmen equino para seu resfriamento ou congelamento.

Durante o resfriamento ou congelamento, os efeitos deletérios do estresse oxidativo aumentam devido a que a maior parte do plasma seminal (PS) é retirada da amostra de sêmen, sendo que a maior capacidade antioxidante do sêmen está em seu PS (BUSTAMANTE et al., 2006). As principais enzimas que degradam os ROS são as catalases (CAT), superóxido dismutase (SOD) e a glutathione peroxidase (GPx). Existe uma ampla variação entre as espécies em relação à importância relativa de cada uma destas enzimas, sendo a CAT, SOD e GPx particularmente abundantes no PS equino (BAUMBER & BALL, 2005; STRADAIOLI et al., 2006).

A maior parte das CAT é de origem prostática, enquanto que a SOD e a GPx derivam das glândulas sexuais anexas e do fluido epididimario e testicular. Além das enzimas, existem outros componentes do plasma seminal que também colaboram na degradação dos ROS. Estes são componentes de baixo peso molecular como a albumina, urate, taurina, hipotaurina, piruvato, lactato, ácido ascórbico, tocoferol e ergotina que também atuam como antioxidantes de baixo peso molecular no plasma seminal (BALL, 2011).

Embora pouco se conheça sobre o papel dos antioxidantes de baixo peso molecular no PS equino, a avaliação da capacidade antioxidante total do PS de outras espécies sugere que estes componentes constituem uma parte importante da capacidade antioxidante do sêmen (BALL, 2012).

O ânion superóxido (O_2^-) é o principal ROS gerado pelos espermatozoides equinos e este radical livre de vida curta é rapidamente dismutado enzimaticamente à forma de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sendo este o principal ROS causador de dano celular. A produção de ânion superóxido pelo espermatozoide equino é mediada pela enzima NADPH oxidase (NOX5) presente na membrana plasmática da cabeça ou nas mitocôndrias dos espermatozoides (BURNAUGH, 2007).

Devido ao ânion superóxido ter uma baixa permeabilidade de membrana, o H_2O_2 provavelmente seria o responsável quase absoluto pela maior parte dos efeitos citotóxicos causados ao espermatozoide equino durante sua refrigeração ou congelamento. Os espermatozoides não viáveis, criodanificados, morfológicamente anormais, particularmente aqueles com gota proximal ou com peças intermediárias anormais, possuem uma produção de ROS aumentada se comparados com aqueles morfológicamente normais e viáveis (BALL, 2011).

Durante a criopreservação, as mitocôndrias frequentemente demonstram uma distensão moderada a marcada que se traduz em um edema ou aumento de tamanho da peça intermediária devido ao stress osmótico. O dano mitocondrial resulta em uma dissociação do metabolismo oxidativo normal e em um aumento dos níveis de ROS (SABEUR & BALL, 2006).

A diminuição da motilidade associada ao ROS ocorre prematuramente e na ausência de alguma outra mudança detectável como a integridade da membrana plasmática ou acrosomal ou no potencial de membrana mitocondrial. Por este motivo a motilidade parece ser um dos primeiros fatores a ser afetados, sendo um indicador sensível de dano oxidativo (BAUMBER et al., 2000).

Por outro lado o estresse oxidativo foi determinado como causador de dano no DNA em uma variedade de tipos celulares incluindo o espermatozoide. No espermatozoide equino o dano no DNA aumenta à medida que aumentam as concentrações de ROS. A fragmentação do DNA foi bloqueada na presença das CAT, ou reduzida na presença da GPx, mas não pela SOD, o qual indica que é o H₂O₂ o causador de dano ao DNA e não o anion superóxido (BALL, 2012).

O dano no DNA espermático foi iniciado em níveis iguais ou menores que o estresse oxidativo causadores dos efeitos adversos na motilidade. A fragmentação do DNA aumenta tanto no sêmen refrigerado, como no congelado e desafortunadamente a adição de antioxidantes nos diluentes não produz nenhum efeito positivo neste parâmetro. É pouco claro porque a adição de antioxidantes ou de enzimas falha em reduzir a fragmentação do DNA durante a refrigeração e criopreservação. Futuras investigações deveriam focar-se neste ponto importante para a produção equina (BAUMBER et al., 2005).

Nos espermatozoides humanos, o dano em seu DNA é secundário ao estresse oxidativo e se apresenta e aumenta antes que qualquer outro parâmetro como a motilidade e/ou a capacidade de união com o ovócito, tornando-se o parâmetro mais sensível para detectar estresse oxidativo (AITKEN et al., 1989). Isto é muito importante já que o estresse oxidativo permite ao espermatozoide com o DNA danificado fertilizar o óvulo. Estudos em outras espécies corroboram o que ocorre em humanos e estabelecem que embora a fertilização possa ocorrer, o desenvolvimento embrionário subsequente diminui, aumentando as perdas embrionárias precoces (AHMADI & NG, 1999; MORRIS et al., 2002). Não existe até o momento uma

informação similar no garanhão, contudo é muito provável que ocorra o mesmo e que o dano ao DNA leve a um aumento nas taxas de perda embrionária (BALL, 2008).

Durante as baixas temperaturas de armazenamento, o espermatozoide equino está sujeito ao dano oxidativo dos fosfolípidos, das proteínas e da cromatina. O estresse osmótico também leva a danos na membrana plasmática e a uma alteração do metabolismo espermático. Além destes fatores, os espermatozoides submetidos à criopreservação sofrem mudanças celulares apoptóticas que levam ao dano e morte celular. Estes três mecanismos (estresse oxidativo, estresse osmótico e mudanças apoptóticas) parecem estar interconectados e parecem impactar vários compartimentos da célula espermática através de vias de ação metabólicas similares (BALL, 2011).

Em resumo, podemos dizer que em condições patológicas de subfertilidade e infertilidade, em animais velhos e durante o resfriamento e congelamento do sêmen, se produz um desbalanço entre a produção e a degradação de ROS, produzindo estresse oxidativo, dano e apoptose celular. A fragmentação do DNA parece ser o dano mais precoce seguido pela queda da motilidade. Isto é importante clinicamente já que os exames convencionais não avaliam o DNA e os espermatozoides pode ter uma boa motilidade, membranas intactas e funcionais e ter um dano na cromatina, o que resulta em uma baixa taxa de prenhez e aumento das perdas embrionárias.

2.7 Associação Butafosfan e Vitamina B₁₂

O Catosal B12[®] (Bayer S.A., São Paulo, Brazil) é uma solução injetável estéril contendo butafosfan 10% e cianocobalamina (vitamina B₁₂). Este medicamento é indicado como tônico veterinário e estimulante metabólico para a prevenção ou tratamento das deficiências de vitamina B₁₂ e fósforo em bovinos, equinos, suínos e aves. Cada mililitro de Catosal B12[®] contém 0,05 mg de cianocobalamina e 100mg de butafosfan, que equivale a 17,3 mg de fósforo orgânico na forma de [1-(n-butil-amino)-1-metiletil]- ácido fosfórico. O Butafosfan e a vitamina B₁₂ modulam várias funções celulares metabólicas, como a oxidação dos ácidos graxos, acetil-CoA e a utilização de piruvato e lactato como substrato energético. Tanto a vitamina B₁₂ como o fósforo aumentam a atividade de várias enzimas antioxidantes importantes no metabolismo celular, intervêm na replicação celular e do DNA e são muito

importantes para a manutenção da estabilidade genética e da homeostasia celular (DENIZ, 2009; LOPES et al., 2010; PEREIRA et al., 2012). Além disso, o butafosfan, ácido α -amino fosfórico, é um forte antioxidante natural que previne a oxidação dos lipídios presentes no organismo (KREUTZKAMPET al., 1967; VIERTEL, 1991)

Existem evidências científicas que o Catosal B12[®] reduz a resposta de estresse em suínos, ovinos, bovinos e roedores (DENIZ et al., 2009). Os mineralocorticoides e os glicocorticoides são hormônios relacionados com a resposta ao estresse e tem ação direta sobre as funções testiculares e reprodutivas. O efeito do estresse sobre as funções reprodutivas dos ganhões tem sido sugerido em alguns trabalhos, sendo um dos mecanismos propostos para o efeito negativo e supressor dos glicocorticoides na síntese de testosterona por parte das células de Leydig afetando se deste modo a espermatogênese e a maturação espermática (AURICH & AURICH, 2008; WAGNER & CLAUS, 2008). O estresse afeta as funções celulares via ACTH e glicocorticoides. A concentração intracelular de glicocorticoides está controlada de maneira enzimática pelas isoformas de 11β – hidroxisteróide desidrogenase (11β – HSD) tipo 1 e 2 as quais convertem o cortisol ativo em cortisona inativa e vice versa (GE et al., 2005; SHARP et al., 2007). Tanto a vitamina B₁₂ como o P participam no funcionamento destas enzimas e ajudam a modular as concentrações intracelulares dos glicocorticoides nos tecidos, mantendo um balanço fisiológico entre o cortisol ativo e a cortisona inativa (WADDELL et al., 2003). Por tanto, estas enzimas tem um efeito protetor sobre as funções testiculares dos ganhões através do controle dos níveis de glicocorticoides nos testículos e epidídimo (HERRERA-LUNA et al., 2010).

A Metilmalonil-CoA mutase é uma enzima dependente da vitamina B₁₂ que afeta a gliconeogênese convertendo o propionato em succinil-CoA, que é requerido para entrar no ciclo de Krebs ou ácido tricarboxílico (TCA) (KENNEDY et al., 1990). O fornecimento adicional de vitamina B₁₂ poderia aumentar a eficiência da produção de energia a partir do piruvato e aumentar a atividade do ciclo TCA, aumentando deste modo a gliconeogênese. O fósforo funciona como um importante sistema tampão a nível sanguíneo e celular, e é um componente crítico de proteínas, fosfolípidos, enzimas, ácidos nucleicos, adenosina trifosfato (ATP) e adenosina monofosfato (AMP) (HEIDEMANN, 2013).

Vários estudos na medicina veterinária foram realizados com Catosal B12[®]. A maioria deles em gado bovino e ovino, não havendo até o momento trabalhos publicados de seu efeito sobre a qualidade seminal. Trabalhos com butafosfan e/ou

Catosal B12[®] em diversas espécies tem mostrado sua eficácia em melhorar a saúde geral, estimulando o apetite, o sistema imune, melhorando as funções digestivas, as funções hepáticas e musculares, assim como também mantendo a homeostase dos sistemas orgânicos. Devido ao seu conteúdo de cianocobalamina, o Catosal B12[®] estimula a produção de glóbulos vermelhos, melhora a concentração de hemoglobina, aumentando o hematócrito e as proteínas plasmáticas totais (DENIZ et al., 2009). Também se observou que o Catosal reduz a incidência de problemas puerperais, aumenta as taxas de prenhez, encurta o período parto concepção, melhora a produção de leite e o ganho de peso, tanto em gado leiteiro como de carne (PALMER, 1980).

O butafosfan existente no Catosal B12[®] é capaz de aumentar o metabolismo energético pelo estímulo no ciclo ADP-ATP, auxiliando o metabolismo celular por meio da doação de P para a síntese de ATP. Somado a isto, há sua associação com a cianocobalamina (vitamina B₁₂), a qual atua na biosíntese da metionina, da colina (aminoácidos essenciais), e na formação da creatinina que promovem o depósito de energia no músculo. Esta comprovada em diversas espécies produtivas que o Catosal melhora o desempenho produtivo e reprodutivo (FLASSHOFF, 1974; ROLLIN et al., 2010; HÄNSEL, 1992; DE GROOT, 2003; HASI, 2004; VAN DER STAAY, 2007).

Experimentos conduzidos no Rio Grande do Sul (Brasil) com aplicação de butafosfan e vitamina B₁₂ em novilhas Aberdeen Angus x Nelore, antes da IA, mostrou taxa de prenhez de 70%, significativamente superior às não tratadas que foi de 45% (GONZÁLEZ et al., 1999). Outro estudo também no Rio Grande do Sul confirma a eficácia do Catosal[®] na melhora do metabolismo general do periparto, na prevenção da cetose subclínica pós-parto e em incrementar o ganho de peso de terneiros durante o início da recria (PEREIRA et al., 2012). Também se viu uma melhora no desempenho reprodutiva em ovelhas (LOPES et al., 2010) porém em equinos a sua eficiência ainda é pouco conhecida.

A vitamina B₁₂ presente no Catosal[®] está relacionada ao metabolismo energético, atuando como cofator enzimático crucial na re-síntese de energia para o organismo (MCDOWELL, 1992). Seus níveis reduzidos prejudicam o aporte de energia para as células e podem comprometer a ingestão alimentar dos animais (REYNOLDS, 2006). O Butafosfan é um composto à base de fósforo orgânico, que tem um importante papel na síntese de energia intracelular e pode servir de substrato para o ciclo ADP/ATP, síntese de creatina-fosfato e intermediários da ação hormonal

(cAMP, cGMP) sendo um importante regulador das taxas de gliconeogênese e glicólise que dependem da disponibilidade de fósforo (HEIDEMANN, 2013).

Embora a cianocobalamina e o butafosfan possam interferir diretamente em certas vias metabólicas, presume-se que exista ainda um efeito indireto sobre o metabolismo hepático, o que poderia explicar a melhora na condição energética de bovinos tratados com estas substâncias (FÜRLI et al., 2006; FÜRLI et al., 2010; ROLLIN et al., 2010).

Este produto provavelmente seja mais eficiente em animais com alto risco de sofrer cetose, animais velhos, animais com má nutrição, animais estressados ou aqueles que sofreram retenção de placenta ou distocias. São necessários mais estudos para poder medir a eficácia deste produto e para estabelecer uma dose ideal para cada caso individual (ROLLIN et al., 2010).

Resumindo, ação sinérgica do butafosfan e da cianocobalamina participam ativamente nos eventos metabólicos, fisiológicos e de multiplicação celular, são importantes para a estabilidade estrutural dos ácidos nucleicos (RNA e DNA), das membranas e participam ativamente nos processos de liberação de energia. Tanto a vitamina B₁₂ como o fósforo orgânico favorecem o aproveitamento energético, melhoram o metabolismo celular e a estabilidade genômica, estabilizam as membranas, diminuem o estresse oxidativo, reduzem os efeitos negativos dos glicocorticoides ante a resposta a fatores estressantes (estresse ambiental, alimentar ou de manejo), melhoram a multiplicação celular, o sistema nervoso e imunológico.

2.8 Vitamina B₁₂:

A vitamina B₁₂ é uma vitamina hidrossolúvel e é um componente próprio do organismo e do metabolismo animal. Esta vitamina não pode ser ingerida em alimentos vegetais, já que nenhum vegetal a contém. Contudo, podemos encontrá-las em alimentos de origem animal, devido a que o organismo é o responsável por sua síntese. Embora a cobalamina (vitamina B₁₂) tenha sido isolada e descoberta há 60 anos, sua bioquímica, fisiologia e efeitos neurológicos ainda se mantêm sem ser bem compreendidos em sua totalidade. Novas observações sugerem uma ação direta destas sobre a função dos ácidos nucleicos e das proteínas; e um papel direto sobre a regulação das citosinas inflamatórias e fatores de crescimento (SOLOMON, 2007).

A vitamina B₁₂ cumpre varias funções metabólicas e atua como coenzima aceptora de hidrogênio. Sua função primordial consiste em atuar como coenzima para reduzir os ribonucleótidos a desoxirribonucleótidos, passo essencial na replicação dos genes. Assim se podem explicar as funções principais da vitamina B₁₂: estimulação do crescimento, e estimulação da síntese e maturação celular. Recentemente se descobriu uma das funções mais importantes das vitaminas B₁₂, que é a de manter a estabilidade da cromatina do DNA. O ácido fólico (vitamina B₉) outra vitamina do complexo B intimamente ligada á vitamina B₁₂ atua como transportador de grupos hidroximetilo e formilo. Talvez o uso mais importante seja a síntese de purinas e timina, necessárias para formar o DNA. Para cumprir sua função o ácido fólico precisa da vitamina B₁₂. Por isso, tanto o ácido fólico, como a vitamina B₁₂, são necessários para a replicação dos genes celulares. Provavelmente assim se explique uma das funções capitais do acido fólico que é a multiplicação celular e a estimulação do crescimento, função que compartilha com a vitamina B₁₂. De fato, quando falta ácido fólico ou vitamina B₁₂ na alimentação os animais apenas crescem e se desenvolvem (AL-MASKARI et al., 2012).

Devido a que a vitamina B₁₂ é um cofator essencial para a enzima metilmalonil CoA mutase, sua deficiência leva a acumulação de ácido metilmalônico que afeta e interrompe o metabolismo mitocondrial produzindo quantidades excessivas de ROS. Os ROS são também produzidos como uma consequência direta da deficiência de vitamina B₁₂ já que induz a produção de citosinas inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF alfa) e aumenta os níveis de homocisteína (HCY) como consequência de uma inibição da metionina sintetase (MTS) causada pela falta de vitamina B₁₂ que é o cofator enzimático. A inibição da MTS causa um bloqueio e aprisionamento do acido fólico como 5-methiltetrahydrofolate o qual o faz indisponível para que participe das reações para a metilação, provocando um aumento na relação dUMP/dTTP e SAM/SAH o qual provoca um aumento de uracilos no DNA. Tanto o uracilo como os ROS causam ruptura das fitas de DNA e juntos com a hipometilação da citosina induzem anormalidades cromossômicas e aumentam o risco de enfermidades degenerativas e do desenvolvimento. Por tanto, deficiências em acido fólico e vitamina B₁₂ produzem danos no DNA e aumento na produção de ROS tendo grande risco de mutação genética (AL-MASKARI, 2012).

Clinicamente, não há até o momento um valor de referência para o diagnóstico de uma deficiência de cobalamina (CHUI, et al., 2001). Também existe resistência as

cobalaminas nos quadros de diabetes, insuficiência renal e idade avançada que levam concomitantemente a uma deficiência funcional das cobalaminas (Cbl) apesar de uma adequada ingestão nutricional. Finalmente, se observou que doses terapêuticas altas de Cbl têm efeitos positivos sobre as uma variedade de desordens, mas ainda falta definir qual seria a melhor via de administração e as doses adequadas. Vários estudos realizados em diversas espécies demonstraram que as recomendações atuais sobre as necessidades de Cbl na dieta são inadequadas para atingir concentrações intracelulares necessárias e assegurar uma estabilidade genômica. Ainda, não estão totalmente claros quais seriam estes requerimentos, mas se sabe que seria muito mais do que se trabalha até o dia de hoje. Outro aspecto importante a levar em conta é a combinação de ácido fólico com as cobalaminas nos programas de suplementação e tonificação. Esta combinação beneficia e maximiza o impacto destas vitaminas devido a vitamina B₁₂ tornar o ácido fólico mais biodisponível potencializando a capacidade do ácido fólico de baixar os níveis sistêmicos de homocisteína (REYNOLDS, 2006; SOLOMON, 2007).

Na década de 60 foram realizados os primeiros estudos sobre os efeitos da vitamina B₁₂ na qualidade de sêmen e na fertilidade tanto em humanos como em bovinos. No entanto, apenas nos últimos anos deu-se novamente importância aos micronutrientes no tratamento da fertilidade do homem. Estudos em homens com histórico de subfertilidade e infertilidade idiopática, má qualidade seminal devido ao sedentarismo, tabagismo, intenso alcoolismo e em homens idosos, demonstraram uma melhora na qualidade seminal quando foram tratados com vitamina B₁₂. Assim como na fertilidade, já que muitos deles voltaram a serem pais quando foram tratados com altas doses de vitamina B₁₂. No touro, também se observou uma melhora nos parâmetros de congelabilidade do sêmen com aumento nas taxas de fertilidade quando se adicionou a vitamina B₁₂ ao diluente do sêmen. Estas melhoras são atribuídas à capacidade que tem a vitamina B₁₂ e o ácido fólico de melhorar o metabolismo, a replicação celular, estabilizar a molécula do DNA, diminuir o estresse oxidativo e regular as respostas inflamatórias. Também tem efeitos sistêmicos, uma vez que melhora a circulação sanguínea e conseqüentemente a oxigenação tecidual, melhorando o sistema nervoso, a função hepática e diminuindo os efeitos adversos do estresse. Os melhores resultados com vitamina B₁₂ foram obtidos em homens com idade avançada ou naqueles com má qualidade seminal associada a uma má qualidade de vida, sem que houvesse melhorias significativas na qualidade espermática de

homens jovens e férteis. Até o momento, não há estudos controlados que correlacionam as vitaminas B₁₂ e o ácido fólico com a fertilidade, qualidade e congelabilidade do sêmen equino.

3. ARTIGO

Administração de Butafosfan e vitamina B12 na qualidade do sêmen fresco e resfriado de garanhões

Nicolás Cazales*^a, Gabriel O. Santos^a, Murilo Farias^a, Henrique B.A. Bastos^a,
Gustavo H.Z. Winter^a, Ivan C. Bustamante-Filho^a, Rodrigo C. Mattos^a.

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

*Bolsista CAPES/UDELAR

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da utilização da associação do butafosfan e da vitamina B₁₂ (Catosal B12[®]) na qualidade do sêmen fresco e refrigerado de garanhões. Foram utilizados quatro garanhões divididos aleatoriamente em dois grupos, A e B, cada um com dois garanhões. Um dos grupos serviu como controle e o outro como grupo tratado. Como tratamento utilizaram-se duas aplicações intramusculares de 5 ml /100 kg PV de Catosal por semana. O projeto se dividiu em 4 etapas de 84 dias cada uma. Na primeira etapa o grupo A foi tratado enquanto que o grupo B serviu de controle. Na segunda etapa ambos os grupos deixaram de ser tratados. Na terceira etapa se inverteram os grupos, sendo o B tratado e o A controle. Finalmente na quarta etapa, nenhum dos grupos foi tratado. Imediatamente após a coleta o sêmen foi avaliado e diluído a uma concentração final de 25×10^6 de espermatozoides por mililitro. O sêmen fresco e refrigerado a 5°C foi avaliado quanto a número total de espermatozoides, motilidade total e progressiva, vigor, morfologia, funcionalidade (HOS test) e integridade de membrana (CFDA/PI staining). Foi realizada ANOVA e as médias pelo teste de Tukey. Não se observaram diferenças significativas entre os grupos tratados e os controles em nenhum dos parâmetros espermáticos avaliados tanto no sêmen fresco quanto no sêmen resfriado. Tampouco foram detectadas interações entre os garanhões para nenhum dos parâmetros observados. O uso prolongado de Catosal intramuscular não teve efeitos negativos e pode ser utilizado com segurança, em garanhões destinados á reprodução. O tratamento intramuscular com Catosal nas doses administradas e recomendadas pelo fabricante, durante 84 dias, não alterou a qualidade do sêmen fresco ou refrigerado por 24 horas dos garanhões jovens e férteis.

Palavras-chave: Catosal, antioxidante, avaliação de sêmen.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the action of butaphosphan, in combination with vitamin B₁₂ (Catosal B12[®]) on the quality of fresh and cooled stallion semen. Four healthy stallions were randomly assigned to two groups A and B (n=2 per group). One acted as control group and the other one as treatment group. The treatment consisted in two intramuscular applications of 5 ml / 100 kg PV of Catosal per week following the manufacturer's doses recommendations. The project was divided in 4 stages of 84 days. In the first stage group A was treated while group B was the control. After that both groups were not treated allowing a washout period for the treated group. Then, the groups were reversed, group B was treated and group A acted as a control. Finally in the last 84 days both groups were kept without any treatment. Semen was diluted to 25 million sperm/mL and evaluated for total sperm count, total and progressive sperm motility (light microscopy), membrane integrity (CFDA/PI staining) and membrane functionality (HOS test) at 0 and 24 hours after preservation at 5° C. Data were analyzed by one way ANOVA and means compared by the Tukey test at 5% level of significance. Experimental endpoints were analyzed to compare the values for the treated stallions in the period of time between the sixty and eighty-four days of treatment versus the same stallions without treatment. No significant differences between treatment and control groups were detected for any of the sperm parameter evaluated in this study. No interactions between stallions were detected. Results show that the use of Catosal for 84 days in the given doses does not alter fresh and cooled semen quality of the young and fertile stallions.

Key words: Catosal, antioxidant, semen evaluation.

3.1 Introdução

Geralmente a etiologia da subfertilidade dos machos é multifatorial. A queda de qualidade seminal resulta provavelmente da interação de fatores genéticos e ambientais que podem ser facilmente manipulados. Em diversas espécies, a nutrição afeta a espermatogênese e, apesar de ser um fator importante que repercute direta e indiretamente na produção e na qualidade espermática, ela é geralmente ignorada e não considerada no diagnóstico e tratamento das afecções reprodutivas. Existe pouca informação sobre a influência de determinados nutrientes na espermatogênese. Isto gerou nos últimos anos, interesse na função das vitaminas B e de certos minerais como moduladores da fertilidade, tanto no homem como nos animais domésticos (BOXMEER et al., 2009).

Durante a espermatogênese, os espermatozoides perdem a maior parte do seu citoplasma, não tendo a capacidade defensiva das enzimas citoplasmáticas e não podendo armazenar nem gerar nutrientes. Isso se traduz em uma maior suscetibilidade ao dano celular e à molécula de DNA (EBISCH et al., 2006; BOXMEER et al., 2009). Deficiências orgânicas de vitamina B₁₂ causam elevação dos níveis sistêmicos de homocisteína (HCY), o que prejudica intensamente o ciclo de remetilação celular. Este ciclo metabólico está envolvido na metilação, reparo e síntese dos fosfolipídios, proteínas, DNA, e RNA. Devido à síntese de DNA ser um processo essencial na espermatogênese, a vitamina B₁₂ é provavelmente importante e qualquer desajuste nessa via metabólica pode prejudicar a função reprodutiva do macho. (WONG et al., 2002; BOXMEER et al., 2009; AL-MASKARI et al., 2012).

O Catosal B12[®] (Bayer S.A., São Paulo, Brasil) é uma solução injetável utilizada como tônico e estimulante metabólico de uso veterinário para prevenção e tratamento de deficiências de vitamina B₁₂ e fósforo em bovinos, equinos, suínos e aves. Este produto contém cianocobalamina (vitamina B₁₂) e Butafosfan, que equivale a fósforo orgânico na forma de [1-(n-butil-amino)-1-metiletil]- ácido fosfórico. O Butafosfan e a vitamina B₁₂ modulam várias funções celulares metabólicas, como a oxidação dos ácidos graxos, acetil-CoA e a utilização de piruvato e lactato como substrato energético. Tanto a vitamina B₁₂ como o fósforo aumentam a atividade de várias enzimas antioxidantes importantes no metabolismo celular, intervêm na replicação celular e do DNA e são muito importantes para a manutenção da

estabilidade genética e da homeostasia celular. Também está comprovado, em diversas espécies, que o Catosal melhora o desempenho produtivo, reprodutivo e reduz a resposta ao estresse dos animais (DENIZ et al., 2009; ROLLIN et al., 2010; LOPES et al., 2010; PEREIRA et al., 2012). Apesar de todos estes atributos, até o momento não existem estudos controlados que avaliem os efeitos do Butafosfan e da cianocobalamina na qualidade seminal dos garanhões. O propósito deste estudo foi avaliar o efeito da utilização da associação do butafosfan e da vitamina B₁₂ na qualidade do sêmen fresco e resfriado de garanhões.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Animais:

Foram utilizados quatro garanhões saudáveis, sendo três da raça Puro Sangue de Corrida e um Pônei Brasileiro, sexualmente maduros, com fertilidade conhecida e boa condição corporal, entre 5 e 13 anos de idade, pertencentes ao REPROLAB, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, Brasil. Os animais se encontravam todos no mesmo local e sujeitos às mesmas condições de manejo. Eram mantidos soltos em piquetes individuais com água e sal mineral à vontade e arraçoados com aveia em grão inteiro e feno de alfafa duas vezes ao dia durante toda a duração do experimento.

3.2.2 Coleta e avaliação do sêmen:

As coletas de sêmen foram realizadas com vagina artificial (VA) modelo Hannover (GÖTZE, 1949), usando uma égua como manequim (KLUG, 1982). A temperatura interna da VA manteve-se entre + 42 e + 45 °C e o sêmen ejaculado foi filtrado para separar o gel restante do ejaculado. Imediatamente após a coleta, a fração livre de gel foi avaliada quanto ao aspecto, cor, odor, volume, concentração, número total de espermatozoides (NTE), motilidade total (MT), motilidade Progressiva (MP), vigor, e morfologia espermática, como descrita pelo Colégio Americano de Teriogenologistas (KENNEY et al., 1983). Posteriormente os ejaculados foram diluídos a uma concentração de 25×10^6 espermatozoides/mL com leite desnatado

UHT e avaliados novamente quanto à motilidade total, progressiva e vigor (KENNEY et al., 1983), funcionalidade de membrana por meio de teste hiposmótico (HOST) (LOMEO & GIAMBERSIO, 1991 modificado por LAGARES et al., 1998) e integridade de membrana, através de contagem de células coradas com diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e iodeto de propídio (PI) mediante microscopia de fluorescência (KNEISSL, 1993), e mediante a técnica de eosina amarelada (coloração supravital) com microscopia óptica (KRAUSE, 1966). Após diluição e avaliação, uma alíquota de 15 mL de sêmen diluído de cada ejaculado foi separada e acondicionada em tubos de ensaio de 15 mL fechados hermeticamente em condições de anaerobiose e refrigeradas horizontalmente em geladeira a uma taxa de resfriamento entre 0,5 e 0,8 °C/min até alcançar a temperatura final de armazenamento de + 5 °C. As amostras refrigeradas a + 5 °C por 24h foram avaliadas novamente nos mesmos parâmetros de motilidade (total e progressiva), vigor, integridade e funcionalidade de membrana previamente descrita.

3.2.3 Delineamento experimental:

3.2.3.1 Pré-tratamento:

Os garanhões foram submetidos a um período de esgotamento espermático. Foram coletados uma vez ao dia durante cinco dias para eliminar as reservas espermáticas extragonadais e uniformizar os ejaculados.

3.2.3.2 Tratamento:

Uma vez terminada a etapa de uniformidade dos ejaculados, os garanhões entraram em um regime de coleta de duas vezes por semana (terças e sextas-feiras) durante os restantes 336 dias de experimento. Os garanhões foram divididos aleatoriamente em dois grupos, A e B, cada um com dois garanhões. Um dos grupos serviu como controle e o outro como grupo tratado. Como tratamento utilizou-se Catosal B12[®] (Bayer S.A., São Paulo, Brasil) contendo 0,05mg de cianocobalamina e 100 mg de butafosfan que equivale a 17,3 mg de fósforo orgânico na forma de [1-(n-butil-amino)-1-metiletil]- ácido fosfórico/mL. Utilizaram-se duas aplicações de 5 mL/100 Kg PV de Catosal B12[®] intramuscular (IM) por semana, seguindo as

recomendações do fabricante, nos mesmos dias das coletas de sêmen. O projeto se dividiu em 4 etapas de 84 dias cada uma.

Na primeira etapa o grupo A (n=2) foi tratado com Catosal B12[®] enquanto que o grupo B (n=2) não foi tratado, servindo de controle. Na segunda etapa os animais do grupo A deixaram de ser tratados para retornar aos seus níveis basais pré-tratamento e o grupo B continuou como controle. Na terceira etapa se inverteram os grupos. O grupo B passou a ser tratado com Catosal B12[®] enquanto que o grupo A ficou como grupo controle. Finalmente na quarta etapa, nenhum dos grupos foi submetido a tratamento algum.

TABELA 1: Esquema gráfico das 5 etapas do tratamento: PEE – Período de esgotamento espermático; CD – Coletas de sêmen diárias; ET 1 – Etapa 1 (tratamento grupo A); ET 2 – Etapa 2 (Período descarte grupo A); ET 3 – Etapa 3 (tratamento grupo B); ET 4 – Etapa 4 (Período descarte grupo B).

GRUPOS	PEE (5dias)	ET 1 (84dias)	ET 2 (84dias)	ET 3 (84dias)	ET 4 (84dias)
A (n=2)	CD	Tratamento	Descarte	Controle	Controle
B (n=2)	CD	Controle	Controle	Tratamento	Descarte

3.2.3.3 Análise estatística:

No presente trabalho foram realizadas um total de 368 coletas de sêmen em um regime de duas coletas por semana dos quatro garanhões participantes deste projeto. Foi proposto um esquema experimental de 2 x 2 crossover, onde quatro garanhões foram divididos aleatoriamente em dois grupos. Os dados foram analisados comparando-se os valores obtidos dos animais tratados entre 60° e o 84° dia de tratamento e os valores dos mesmos garanhões durante os períodos controle (Figura 1). Os ejaculados obtidos durante os períodos de descarte (Figura 1) e entre os dias 1° e 63° dos períodos de tratamento não foram utilizados. O total de ejaculados analisados foi de 85. Foi realizada análise de variância, adotando um modelo de parcelas subdivididas com períodos de tratamento e controles. Sendo as variáveis independentes os garanhões e como variáveis dependentes o volume, concentração, NTE, MT, MP, vigor, integridade e funcionalidade de membrana e morfologia

espermática. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente através ANOVA e as médias avaliadas pelo teste de Tukey com um nível de significância de 5%.

3.3. RESULTADOS

Não se observaram diferenças significativas entre os grupos tratados e os controles em nenhum dos parâmetros espermáticos avaliados, tanto no sêmen fresco (Tabela 1) quanto no sêmen resfriado (Tabela 2).

Tabela 2: Valores das médias, desvio padrão e *P* do sêmen fresco durante os 24 dias finais dos períodos tratamento (TR) e controle (CN).

	TR	CN	<i>P</i>
Volume (mL)	37,2 ± 14,3	39,2 ± 18,4	0,62
Concentração (x10 ⁶ spz/mL)	156,5 ± 72,7	160,6 ± 80,8	0,82
NTE (x10 ⁶ spz)	5250 ± 2,4	6010 ± 3,4	0,29
Motilidade Total (%)	75 ± 15	71 ± 12	0,22
Motilidade Progressiva (%)	54 ± 17	51 ± 16	0,43
Vigor (1 – 4)	3,8 ± 0,7	3,8 ± 0,7	0,99
Membrana Plasmática Funcional (HOST, %)	68,6 ± 13,3	67,4 ± 12,7	0,71
Membrana Plasmática Íntegra (CFDA/PI, %)	71,2 ± 13,6	70,7 ± 10,7	0,84
Coloração supravital (eosina, %)	73,4 ± 14,2	71,8 ± 11,4	0,60
Morfologia Espermática Normal (%)	58 ± 15	54 ± 12	0,22

(NTE – número total de espermatozoides)

Tabela 3: Valores das médias, desvio padrão e *P* do sêmen resfriado por 24 horas a +5°C nos 24 dias finais dos períodos tratamento (TR) e controle (CN).

	TR	CN	<i>P</i>
Motilidade Total (%)	54 ± 21	49 ± 18	0,27
Motilidade Progressiva (%)	38 ± 18	32 ± 16	0,14
Membrana Plasmática Funcional (HOST, %)	49 ± 16	50 ± 15	0,62
Membrana Plasmática Íntegra (CFDA/PI, %)	60 ± 16	58 ± 15	0,63
Coloração Supravital (eosina, %)	64 ± 16	61 ± 15	0,56

Não foram detectadas interações entre os ganhões para nenhum dos parâmetros observados.

3.4 DISCUSSÃO

O Catosal B12[®] é um suplemento tônico veterinário indicado para animais em crescimento e com alta demanda energética. Até o momento se desconhece se o uso prolongado de Catosal afetaria a espermatogênese e a fertilidade dos machos. Estudos em diferentes espécies demonstraram a importância da vitamina B₁₂ na espermatogênese e seus efeitos positivos sobre a qualidade seminal, porém se desconhecem estudos similares em garanhões (WATSON, 1962; FURNASS, 1963; BLAIR et al., 1968; WONG et al., 2002; BOXMEER et al., 2009; SCHMID et al., 2012).

Esta pesquisa demonstrou que o uso prolongado de Catosal não altera a qualidade seminal dos garanhões jovens e férteis. O Catosal pode ser utilizado de maneira segura em garanhões que serão destinados a reprodução já que não apresentou efeitos adversos sobre os parâmetros seminais avaliados, tanto do sêmen fresco como resfriado. Ainda não foram feitas provas de fertilidade as quais deverão ser realizadas no futuro para se obter dados que corroborem os obtidos *in vitro* até o momento.

Neste estudo, testou-se a hipótese de que a ação sinérgica do butafosfan e da cianocobalamina participam ativamente nos eventos metabólicos, fisiológicos e de multiplicação celular. Estes elementos são importantes nos processos de liberação de energia e na estabilidade estrutural dos ácidos nucléicos e das membranas celulares. Tanto a vitamina B₁₂ como o fósforo orgânico diminuem o estresse oxidativo, reduzem os efeitos negativos dos glicocorticoides ante a resposta a fatores estressantes, melhoram a multiplicação celular e o sistema circulatório. Portanto, uma fonte de fósforo orgânico e de vitamina B₁₂ como suplemento para aumentar sua disponibilidade no organismo, poderia melhorar a espermatogênese e a qualidade seminal de alguns garanhões subférteis ou senis, sobre tudo após serem submetidos ao resfriamento.

A administração intramuscular de vitamina B₁₂ é efetiva não somente na correção de anemias, mas também na melhora na maturação e motilidade dos espermatozoides humanos (Sharp & Witts, 1962). Por outro lado, o trabalho de Busch (1957) mostrou que a adição de vitamina B₁₂ ao sêmen armazenado de touros melhorou a motilidade e incrementou seu grau de fertilidade. Adams (1958) mostrou que baixos níveis de vitamina B₁₂ no sêmen precederam a anemia por vários meses, e

sugeriu que a deficiência vitamínica pode ser responsável por infertilidade humana. Blair et al. (1968) investigaram dois homens com pobre qualidade seminal (possivelmente devido a intenso tabagismo e consumo alcoólico), que melhoraram bastante durante um período de 7 meses administrando injeções intramusculares semanais de 30g de vitamina B₁₂. Estes casos confirmam outros trabalhos avaliando a influência da vitamina B₁₂ na fertilidade dos mamíferos; sugerindo que a vitamina B₁₂ pode ser benéfica no tratamento de baixa fertilidade dos machos (BLAIR et al., 1968; SCHMID et al., 2012).

Os resultados do presente estudo demonstraram que a administração IM de Catosal B12[®] a uma dose de 5 mL/100 Kg PV, duas vezes por semana por 84 dias não modificou nenhum dos parâmetros seminais avaliados. Isso se contrapõe aos resultados obtidos em outras espécies, em que a utilização de vitamina B₁₂ melhorou os parâmetros seminais no homem e no touro (WATSON, 1962; FURNAS, 1963; BLAIR et al., 1968; WONG et al., 2002; BOXMEER et al., 2009; SCHMID et al., 2012). Isso, possivelmente, se deve ao fato de que os garanhões utilizados neste trabalho foram garanhões jovens e férteis, com boa qualidade seminal. Além disso, no nosso estudo se utilizou somente a combinação de vitamina B₁₂ com Butafosfan, diferentemente dos suplementos utilizados em outros experimentos onde além da vitamina B₁₂ se utilizou vitamina B 9 (ácido fólico), zinco e outras vitaminas como antioxidantes. O ácido fólico, o zinco e as cobalaminas se complementam e atuam sinergicamente nas vias metabólicas potencializando seus efeitos (AL-MASKARI et al., 2012). Estudos em animais, *in vivo* e *in vitro*, encontraram que a deficiência de zinco altera a absorção e metabolismo do ácido fólico e de vitamina B₁₂ na dieta e que a falta de vitamina B₁₂ diminui a disponibilidade de ácido fólico no organismo (FAVIER et al., 1992). Apesar do ácido fólico, da vitamina B₁₂ e do zinco serem essenciais para síntese de RNA e DNA, os mecanismos por trás do efeito desses micronutrientes na espermatogênese ainda não estão claros (WONG et al., 2002).

Geralmente o DNA espermático é um dos primeiros parâmetros afetados frente ao estresse oxidativo, antes que a motilidade e a integridade das membranas, o que o torna um parâmetro sensível de detecção precoce de dano celular (AGARWAL & SAID, 2003; GIWERCMAN et al., 2003; LOVE et al., 2005; VARNER & JOHNSON, 2011). Atualmente o índice de fragmentação do DNA pode ser medido e avaliado por meio do teste de fragmentação do DNA ou o Teste Cometa, análise com melhor capacidade de diagnóstico e prognóstico da qualidade espermática que a

análise convencional (BOXMEER et al., 2009). Uma provável limitação deste estudo foi não ter-se avaliado a fragmentação do DNA espermático, parâmetros no qual a vitamina B₁₂ e o fósforo causariam maior impacto (FENECH, 2001; FENECH, 2012).

No presente trabalho a dose de cianocobalamina utilizada e recomendada pelo fabricante pode ter sido a causa de não ter se obtido melhora na qualidade seminal dos ganhões tratados. As doses utilizadas foram muito menores do que as utilizadas e recomendadas em bovinos (ROLLIN et al. 2010) e humanos (SOLOMON, 2007; FENECH, 2012). Resultados com base em uma variedade de biomarcadores de dano do DNA sugerem que, pelo menos, três vezes acima dos níveis de ingestão recomendados na dieta de ácido fólico e vitamina B₁₂ são necessárias para conseguir concentrações terapêuticas adequadas de vitamina B₁₂ e ácido fólico nos tecidos para minimizar os danos no DNA (FENECH et al., 2012).

A utilização de vitamina B₁₂ e butafosfan podem aumentar os níveis de AMPc e Ca⁺⁺ intracelulares facilitando o processo de capacitação espermática. A vitamina B₁₂ e o fósforo favorecem a fosforilação, ativando a adenilato ciclase e a proteína cinase A, imprescindíveis para a capacitação espermática (VARNER & JOHNSON 2011; AMANN & GRAHAM, 2011) e de importância na fertilização *in vitro*. Entretanto isto não foi testado no presente experimento.

A vitamina B₁₂ e o butafosfan diminuem os efeitos negativos dos glicocorticoides sobre a espermatogênese e maturação espermática (DENIZ et al. 2009; AURICH & AURICH, 2008). Tanto a vitamina B₁₂ e o Fósforo participam no funcionamento das enzimas que modulam as concentrações intracelulares de glicocorticoides, mantendo um balance entre o cortisol ativo e a cortisona inativa (GE et al., 2005; SHARP et al., 2007). Portanto, o Catosal poderia ter um efeito protetor sobre as funções testiculares dos ganhões em situações de estresse ou tratamento prolongado com corticoides. Este efeito não foi observado no presente experimento provavelmente por terem sido utilizados ganhões com bom padrão seminal e sem estar em situação de estresse.

A Vitamina B₁₂ tem um efeito sistêmico melhorando a circulação sanguínea e conseqüentemente a oxigenação tissular (MARBACH, 1978; MARBACH; 1980; COPPO, & GAPEL, 2000; SOLOMON, 2007). Portanto, a utilização do Catosal poderia ser testada como coadjuvante no tratamento de ganhões com alterações circulatórias reprodutivas como a varicocele.

Para os humanos já existe uma variedade de produtos comerciais ricos em vitamina B₁₂, ácido fólico, zinco, antioxidantes, aminoácidos e minerais para o tratamento de problemas reprodutivos no homem. Os achados anteriores enfatizam a importância dos citados micronutrientes na espermatogênese e ao contrário dos fatores genéticos os fatores nutricionais podem ser alterados. Por tanto, a suplementação oral ou parenteral é uma ferramenta útil e comprovada para o tratamento da subfertilidade dos machos. Entretanto, ainda estão por se definir quais micronutrientes e que doses causam maior impacto na fertilidade dos garanhões que levem a um aumento nas taxas de prenhez (CHUI, et al., 2001; WONG et al., 2002).

Provavelmente para futuros estudos seja necessário aumentar a dose de Catosal combinando-o com ácido fólico e zinco e utilizando-o em garanhões velhos ou com problemas de fertilidade. O uso prolongado de Catosal B12[®] intramuscular não teve efeitos negativos e pode ser utilizado, rotineiramente e com segurança, em garanhões destinados á reprodução. O tratamento intramuscular com Butafosfan e vitamina B₁₂ nas doses administradas e recomendadas pelo fabricante, durante 84 dias, não alterou a qualidade do sêmen fresco ou refrigerado por 24 horas dos garanhões jovens e férteis.

4. CONCLUSÕES

O uso prolongado de Catosal B12[®] intramuscular não teve efeitos negativos, pode ser utilizado rotineiramente e com segurança em garanhões.

O tratamento intramuscular com Butafosfan e vitamina B₁₂ nas doses recomendadas pelo fabricante, durante 84 dias não alterou a qualidade do sêmen fresco ou refrigerado por 24 horas dos garanhões jovens e férteis.

5. BIBLIOGRAFIA

ADAMS, J. F. Vitamin B₁₂ and fertility. **Scottish Medical Journal**, v. 3. p. 21, 1958.

AGARWAL, A.; SAID, T.M. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. **Human Reproduction Update**, v. 9; p. 331–45, 2003.

AHMADI ALI; NG SC. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. **Journal of Experimental. Zoology**, v. 284, p. 696-704, 1999.

AITKEN, R.J. CLARKSON, J.S.; FISHEL, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 183-197, 1989.

AL-MASKARI, M.Y.; MOSTAFA, I.; WALY, M.P.H.; AMANAT, ALI; YUSRA, S; AL-SHUAIBI; ALLAL OUHTIT, M.P.H. Folate and vitamin B12 deficiency and hyperhomocysteinemia promote oxidative stress in adult type 2 diabetes. **Nutrition**, v. 28, p. e23–e26, 2012.

ALMEIDA, J.; BALL, B.A. Effect of α -tocopherol and tocopherol succinate on lipid peroxidation in equine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 87, p. 321–337, 2005.

ALVAREZ, J.G. & STOREY, B.T. Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa: its effects on sperm motility. **Biology of Reproduction**, v. 27, p. 1102-1108, 1982.

ALVAREZ, J.G. & STOREY, B.T. Assessment of cell damage caused by spontaneous lipid peroxidation in rabbit spermatozoa. **Biology of Reproduction**. v. 30, p. 823-831, 1984.

ALVAREZ, J.G. & STOREY, B.T. Lipid peroxidation and the reaction of superoxide and hydrogen peroxide in mouse spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 30, p. 833-841, 1984.

ALVAREZ, J.G. & STOREY, B.T. Taurine, hypotaurina, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. **Biology Reproduction**, v. 29, p. 548-555, 1983.

AMANN, R.P. & PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 3, p. 145-173, 1987.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoa function. In: MCKINNON A.O.; VOSS J.L. (eds). **Equine Reproduction**. 1st ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, p. 715-745.

AMANN, R.P. & GRAHAM, J.K. Spermatozoa function. In: MCKINNON A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER D.D. (eds). **Equine Reproduction**. 2nd ed. Wiley-Blackwell, 2011. p. 1053-1084.

ARLAS, T. R. Sperm quality is improved feeding stallions with a rice oil supplement. **Animal Reproduction Science**, v.107, p. 306, 2008.

AUGER, J.; KUNSTMANN, J.M.; CZYGLIK, F.; JOUANNET, P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. **The New England Journal of Medicine**, v. 332, p. 281–285, 1995.

AURICH, C. Effect of a dietary antioxidant supplementation on semen quality in pony stallions. **Theriogenology**, v. 69, p. 940–945, 2008.

AURICH, C.; AURICH, J.E. Effects of stress on reproductive function in the horse. **Pferdeheilkunde**, v. 24, p. 99-102, 2008.

AURICH, E. J. Artificial Insemination in Horses: More than a Century of Practice and Research. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, n. 8, p. 458-463, 2012.

BALL, B.A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 257-267, 2008.

BALL, B.A. Oxidative stress in sperm. In: MCKINNON A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER D.D. (eds). **Equine Reproduction**. 2nd ed. Wiley-Blackwell 2011; p. 991-995.

BAUMBER, J. The effects of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 895-902, 2000.

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J. Assessment of the cryopreservation of equine spermatozoa in the presence of enzyme scavengers and antioxidants. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, p. 772-779, 2005.

BIELANSKI, W. The evaluation of stallion semen in aspects of fertility control and its use for artificial insemination. **Journal of Reproduction and Fertility**, p. 19-24, 1975.

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

BLAIR, J.H.; STEARNS, H.E.; SIMPSON, G.M. Vitamin B₁₂ and fertility. **The Lancet**, v. 1, p. 49-50, 1968.

BLOM, E. Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of bull spermogram. **Nordisk Veterinaer Medicin**, v. 25, n. 7-8, p. 383, 1973.

BOXMEER, J.C.; MARIJ SMIT; ELAINE UTOMO; JOHANNES, C. ROMIJN; MARINUS, J. C. EIJKEMANS; JAN LINDEMANS; JOOP S. E. LAVEN; NICK, S. MACKLON; ERIC, A. P. STEEGERS; REGINE, P. M. STEEGERS-THEUNISSEN. Low folate in seminal plasma is associated with increased sperm DNA damage. **Fertility and Sterility**, v. 92, n. 2, p. 548-556, 2009.

BOXMEER, J.C.; SMIT, M.; WEBER, R.F.; LINDEMANS, J.; ROMIJN, J.C.; EIJKEMANS, M.J. Seminal plasma cobalamin significantly correlates with sperm concentration in males undergoing IVF or ICSI procedures. **Journal of Andrology**, v. 28, p. 521–527, 2007.

BRINSKO, S.P.; VAN WAGNER, G.S.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L. Motility, morphology, triple stain analysis of fresh, cooled, and frozen–thawed stallion spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertil**, v. 56, (Suppl):111–120, 2000.

BRINSKO, S.P. Effect of feeding a DHA-enriched nutraceutical on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen. **Theriogenology**, v. 63, p. 1519–1527, 2005.

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

BURNAUGH, L.; SABEUR, K.; BALL, B.A. Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium. **Theriogenology**, v. 67, p. 701-706, 2007.

BUSCH, E. Seminal vitamin B₁₂ and sterility. **Animal Breeding Abstracts**, v. 25, p. 147, 1957.

BUSTAMANTE-FILHO, I.C.; PEDERZOLLI, A.M.; SGARAVATTI, A.M.; MATTOS, R.C.; DUTRA-FILHO, C.S.; JOBIM, M.I.M. Activity of glutathione peroxidase and catalase in stallion semen during cryopreservation. **Animal Reproduction Science**. v. 94, p. 70-73, 2006.

CHUI CHUNG HIN; FUNG YI LAU; RAYMOND WONG; OI YAN SOO; CHUK KWAN LAM; PUI WAI LEE; HO KEI LEUNG; CHIU KUI SO; WAI CHIU TSOI; NELSON TANG; WAI KEI LAM; GREGORY CHENG. Vitamin B12 Deficiency—Need for a New Guideline. **Nutrition**, v. 17, p. 917-920, 2001.

CIERESZKO, A.; DABROWSKI, K. Sperm quality and ascorbic acid concentration in rainbow trout semen are affected by dietary vitamin C: an across-season study. **Biology of Reproduction**, v. 52, p. 9828, 1995.

COTGREAVE, I.A.; MOLDEUS, P.; ORRENIUS, S. Host biochemical defense mechanisms against prooxidants. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 28, p. 189–212, 1988.

COPPO, J.A. & GAPEL, E.R.: Results from Catosal B12 applied on race horses in Argentina. **A hora veterinaria**, v. 19, n. 113, p. 46-48, 2000.

DENIZ, A.; SPIECKER-HAUSER, U.; REHAGEN, M. Efficacy of a Butafosfan and Vitamin B12 Combination (Catosal®) on Biochemical and Hematological Blood Parameters in Dogs Treated with Dexamethasone. **International Journal of Apply Research of Veterinary Medicine**, v. 7, n.3, p. 116-129, 2009.

DE GROOT, J.; VAN DER WERF, J.; VAN REENEN, C.; SCHUURMAN, T.; SCHMIDT, B. The effects of butafosfan (component of Catosal®) on psychosocial stress in pigs. Proceedings of the 9th International Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 26, n. 1, p. 222-223, 2003.

EBISCH, I.M.; PETERS, W.H.; THOMAS, C.M.; WETZELS, A.M.; PEER, P.G. STEEGERS- THEUNISSEN R.P. Homocysteine, glutathione and related thiols affect fertility parameters in the (sub)fertile couple. **Human Reproduction Update**, v. 21, p. 1725-1733, 2006.

EBISCH, I.M.; THOMAS, C.M.; PETERS, W.H.; BRAAT, D.D.; STEEGERS- THEUNISSEN R.P. The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. **Human Reproduction Update**, v. 13, p. 163-174, 2007.

ESTUDIOSKREUTZKAMP, N.; SCHIMPFKY, C.; STORCK K.Über die Darstellung und Eigenschaften von Amino-phosphonigdsäuren. **Archiv der Pharmazie**, v. 10, p. 868-874, 1967.

FAVIER, A.E. The role of zinc in reproduction. Hormonal mechanisms. **Biological Trace Element Research**, v. 32, p. 363-382, 1992.

FENECH, M. The role of folic acid and Vitamin B₁₂ in genomic stability of human cells. **Mutation Research**, v. 475, p. 57-67, 2001.

FENECH, M. Folate (vitamin B9) and vitamin B₁₂ and their function in the maintenance of nuclear and mitochondrial genome integrity. **Mutation Research**, v. 733, p. 21-33, 2012.

FLASSHOFF, F.H.: Clinical and chemical blood serum investigations in cattle and treatment studies with ornithine-aspartate-product HMV 20 and with Catosal for the reduction of fertility and health disorders. **Doctorate Thesis, Tierärztliche Hochschule Hannover, Germany**, 1974.

FORGES, T.; MONNIER-BARBARINO, P.; ALBERTO, J.M.; GUEANT-RODRIGUEZ, R.M.; DAVAL, J.L.; GUEANT, J.L. Impact of folate and homocysteine metabolism on human reproductive health. **Human Reproduction Update**, v. 13, p. 225-238, 2007.

FÜRLI, M.; DENIZ, A.; WESTPHAL, B.; ILLING, C.; CONSTABLE, P.D. Effect of multiple intravenous injections of butaphosphan and cyanocobalamin on the metabolism of periparturient dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 9, p. 4155-4164, 2010.

FÜRLI, M.; WITTEK, T.; GENGENBACH, S.; SCHMIDT, B. Effects of preoperative application of butafosfan and cyanocobalamin on reconvalescence, clinico-chemical parameters, antioxidative metabolism and postoperative abomasal emptying in cows with abomasal dislocation. **Tieraerztl. Prax. Ausg. Grosstiere Nutztiere**, 2006; 34:351–356.

FURNASS, S.B. Seminal vitamin B₁₂ and sterility. **The Lancet** 1963, p. 59-60.

GADELLA B.M. Sperm membrane physiology and relevance for fertilization. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 229, 2008.

GADELLA B.M. & VAN GESTEL, R. A. Bicarbonate and its role in mammalian sperm function. **Animal Reproduction Science** 82–83 (2004) 307–319.

GALLI, A. Freezability of equine sperm: a preliminary study on two commercial extenders. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, p. 486, 2012.

GE, R.S. 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase 2 in rat laydig cells: its role in blunting glucocorticoid action at physiological levels of substrate. **Endocrinology**. v. 146, p. 2657-2664, 2005.

GEE, E.K. Effect of dietary vitamin E supplementation on spermatozoa quality in stallion with suboptimal post-thaw motility. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 324, 2008.

GILBERT, R.O. & FALES, M.H. The effect of bovine seminal plasma on the function and integrity of bovine neutrophils. **Theriogenology**, v. 46, p. 649-658, 1996.

GINTHER, O.J. Reproductive seasonality. In: Ginther O.J., editor. **Reproductive biology of the mare, basic and applied aspects**. Equiservices; 1992. p. 105-134.

GIWERCMAN, A.; RICHTHOFF, J.; HJOLLUND, H.; BONDE, J.P.; JEPSON, K.; FROHM, B. Correlation between sperm motility and sperm chromatin structure assay parameters. **Fertility and Sterility**, v. 80, p. 1404-1412, 2003.

GONZALÉZ, F.H.D.; SILVA S.C. **Introdução à Bioquímica Veterinária; Editora da UFRGS; Segunda Edição**; 2006. v. 55; p 229-230.

GÖTZE, R. Besamung und Unfruchtbarkeit der Haussäugetiere. Hannover: Scharper Verlag, 1949.

GRASBECK, R.; SALONEN, E.M. Vitamin B₁₂. **Progress in Food & Nutrition Science**, v.2, p.193-231, 1976.

HAGGARTY, P.; Mc CALLUM, H.; Mc BAIN, H.; ANDREWS, K.; DUTHIE, S.; Mc NEILL, G.; TEMPLETON, A.; HAITES, N.; CAMPBELL, D.; BHATTACHARYA, S. Effect of B vitamins and genetics on success of in-vitro fertilisation: prospective cohort Study. **The Lancet**, v. 367, p.1513-1519, 2006.

HAMMERSTEDT, R.H.; LOVRIEN, R.E. Calorimetric techniques for metabolic studies of cells and organism under normal conditions and stress. **Journal of Experimental Zoology**, v. 228, p. 459-469, 1983.

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

HAMMERSTEDT, R.H. & GRAHAM, J.K. Cryopreservation of Poultry Sperm: The Enigma of Glycerol. **Cryobiology**, v. 29, p. 26-38, 1992.

HÄNSEL, A.; FUHRMANN, H.; SALLMANN, H.P.; KLEE, W. Intravenous infusion of volatile fatty acids as a loading test for the evaluation of possible effects of Butafosfan on the energy metabolism of cattle. **Berliner Münchener Tierärztliche Wochenschrift**. 1992, v. 105: 361-366.

HARRIS, M.A. Effect of feeding an omega-3 rich supplement on the fatty acid composition and motion characteristics of stallion spermatozoa. **Proceeding of the Annual Meeting on Equine Science**, v.19, p. 239, 2005.

HARRIS, M.A. Stallion spermatozoa membrane phospholipids dynamics following dietary n-3 supplementation. **Animal Reproduction Science**. 2005; 89: 234-237.

HASI, S.; DU, X.; ZHU, B.; JIANG, J. Studies on effects of compound butaphosphan solution on endurance capability and energy metabolism in mice. **Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica** 2004b; 35 (3):290 - 294.

HEIDEMANN, S.R. The cell. In: Cunnighams text book of veterinary physiology. Bradley G. Klain (ed). Fifth edition. 2013, p. 1-25.

HELORDOY, D. Effect of dietary supplementation with DHA on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 319, 2008.

HERRERA-LUNA, C.V. Cortisol receptor and glucocorticoid-metabolizing enzymes (11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 2) in equine testicular and epididymal tissue. **Animal Reproduction Science**, v.121S, p. S134-S136, 2010.

INSKEEP, P.B.; MAGARGEE, S.F.; HAMMERSTEDT, R.H. Alterations in Motility and Metabolism Associated with Sperm Interaction with Accessory Sex Gland Fluids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 241, n. 1, p. 1-9, 1985.

JEYENDRAN, R.S.; VANDERVEM, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B.G.; ZANEVELD, L.J.D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 70, p. 219-228, 1984.

JANETT, F. Seasonal changes in semen quality and freezability in the Warm blood stallion. **Theriogenology**, v. 60, p. 453-461, 2003.

JASKO, D.J. Evaluation of stallion semen. In: Blanchard TL, Varner DD. **Veterinary Clinic of North America, Equine Practice**. 1992; v. 8, p.129-148.

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

KANKOFER, M.; KOLM, G.; AURICH, J.; AURICH, C.; Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5°C. **Theriogenology**, v. 63, p. 1354-1365, 2005.

KARESKOSKY, M. & KATILA, T. Components of stallion seminal plasma and the effects of seminal plasma on sperm longevity. **Animal Reproduction Science**, v.107; n. 3-4; p. 249, 2008.

KATILA, T. In Vitro Evaluation of Frozen-Thawed Stallion Semen: A Review. **Acta veterinaria Scandinavica**, v. 42, p. 199-217, 2001.

KENNEDY, D.G. Methylmalonyl-CoA mutase (EC 5.4.99.2) and methionine synthetase (EC 2.1.1.13) in the tissues of cobalt-vitamin B12 deficient sheep. **British Journal of Nutrition**, v. 64, p. 721-732, 1990.

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

KRAUSE, D. Untersuchungen am Bullensperma unter Berücksichtigung der Fertilitäts diagnostischen Bedeutung der Befund. **Tese (Livro Docencia em Medicina Veterinaria)**, Tierärztliche Hochschule – Hannover, Deutschland, 1966.

KREUTZKAMP, N.; SCHIMPFKY, C.; STORCK, K. Über die Darstellung und Eigenschaften von Amino-phosphonsäuren. **Archiv der Pharmazie**, 1967; 10: p. 868-874.

KLUG, E. Untersuchungen zur klinischen Andrologie des Pferdes – die Bedeutung andrologischer Befunde am Hengst für den Zuchteinsatz. 1982. 101 f. **Tese (Livro Docência em Medicina Veterinaria)**. Escola Superior de Veterinaria, Hannover, Alemanha, 1982.

KNEISSL, S. Tiefgefrierkonservierung Von PferdeSperma: Einfluss der Samenentnahmetechnik, zentrifugation, Konfektionierungsform und Einfriermethode auf die Motilität und Membranintegrität der Samenzellen. **Tese (Doutorado em Medicina Veterinaria)**, Hannover, Tierärztl. Hochsch. 1993.

KUROKI, Y.; IWAMOTO, T.; LEE, J.W.; YOSHIKE, M.; NOZAWA, S.; NISHIDA, T. Spermatogenic ability is different among males in different Y chromosome lineage. **Journal of Human Genetics**, v. 44, p. 289-92, 1999.

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

LAGARES, M.A.; PETZOLDT R.; SIEME, H.; KLUG, E. Preservação do sêmen fresco equino: Avaliação da integridade da membrana espermática sob condições hiposmóticas. **Arquivos da Faculdade de Veterinária, UFRGS**, v.26, n. 1, p. 2942, 1998.

LASKO, J. Calcium/calmodulin and c AMP/protein kinase-A pathways function in sperm motility regulation in the stallion. **Animal Reproduction Science**, v. 121S, p. S173-S174, 2010.

LIMA R.A.S.; SHIROTA R.; BARROS G.S.C. Estudo do complexo do agronegócio cavalo. **Centro de estudos avançados em economia aplicada, CEPEA/ESALQ/USP**. Piraciaba, 2006.

LOMEO, A.M. & GIAMBERSIO, A.M. Water test: A simple method to assess sperm membrane integrity. **International Journal of Andrology**, v. 14, p. 278-282, 1991.

LOOMIS, P.R. The equine frozen semen industry. **Animal Reproduction Science**, v. 68, p. 191-200, 2001.

LOPES, G.F.; LEHUGEUR, C.M.; DREYER, C.T.; RIBEIRO, L.A.O. Efeito da aplicação de Catosal B12[®] no início do encarneamento sobre a eficiência reprodutiva de ovelhas mantidas a campo no Rio Grande do Sul/Brasil. **A Hora Veterinária**, v. 30, n. 178, p. 13-17, 2010.

LOVE, C.C.; THOMPSON, J.A.; LOWRY, V.K.; VARNER, D.D. Effect of storage time and temperature on stallion sperm DNA and fertility. **Theriogenology**, v. 57, p. 1135-1142, 2002.

LOVE, C.C. The sperm chromatin structure assay: A review of clinical applications. **Animal Reproduction Science**, v. 89, p. 39, 2005.

LOVE, C. C. Measurement of Concentration and Viability in Stallion Sperm. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, 8, p. 464-466, 2012.

MANN, T. Metabolism of semen: Fructolysis, respiration and sperm energetic. In: MANN T. (ed) **The biochemistry of the semen and the male reproductive tract**. New York. Barnes and Noble. 1964; p. 265-307.

MANN, T.; LUTWARK-MANN, C. Biochemistry of stallion semen. **J. Reproduction and Fertility**, v. 23, p. 47-52, 1975.

MANN, T.; LUTWARK-MANN, C. Storage of semen for artificial insemination. In: MANN T. AND LUTWARK-MANN C. (eds) **Male reproduction and semen**. New York. Springer Verlag. 1981, p. 23-28.

MARBACH, W.: Hämatologische Parameter zur Kondition von Rennpferden und die Wirkung von Coforta/ Catosal auf das erschöpfte. **Pferde Veterinär Medizin Nachricht**, v. 1, p. 82-92, 1978.

MARBACH W: Alkalische Phosphatase (AP) und Aspartataminotransferase(AST) des Blutplasmas als Parameter der Kondition von Rennpferden und die Wirkung von Coforta/Catosal auf diese Enzyme. **Pferde Veterinär Medizin Nachricht**, v. 12, p. 63-69, 1980.

MCDOWELL, R. L. **Minerals in animal and human nutrition**. San Diego:Academic Press, p.524, 1992.

MELO, C.M. Influence of sperm motility factors on spermatozoa obtained from different epididymal segments. **Animal Reproduction Science**, v. 121S, p. S178-S179, 2010.

MERKT, H.; JACOBS, K.O.; KLUG, E.; AUKES, E. An analysis of stallion fertility rate (foals born alive) from Breeding Documents of the Landgestüt Celle over a 158 year period. **Proceedings of the second international symposium on equine reproduction**. 1979, Supplement 27, p. 73-77.

MORRIS, I.D.; ILOTT, S.; DIXON, L.; BRISON, D.R. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Commet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. **Human Reproduction**, v. 17, p. 990-998, 2002.

NADINE, F. Vitamin B12 among parturient and their newborns its relationship with birthweight. **European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology**, v. 45, p. 155-163, 1992.

NEILD, D.; CHAVES, G.; FLORES, M.; MORA, N.; BECONI, M.; AGÜERO, A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 51, n. 4, p. 721-727, 1999.

OLIVEIRA, A.A.M.A.; FURTADO, C.E.; VITTI, D.M.S.S.; RESENDE, F.D.; CABRAL FILHO, S.L.S.; TOSI, H.; WINKLER B. Phosphorus bioavailability in diets for growing horses. **Livestock Science**, v. 116, p. 90-95, 2008.

PALMER, C. R. "Metaphylaxis" in post-partum conditions in dairy cows with butaphosphone: A trial under South African conditions. **Journal of. South Africa Veterinary. Association**, v. 51, p. 239-242, 1980.

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

PEÑA, F.J.; FERRUSOLA, C.O.; TAPIA, J.A.; APARICIO, I.M. How stallion sperm age in vitro? Scenario for preservation technologies. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, p. 451-454, 2012.

PEREIRA, R.A.; Farias, L.B.; Theobald, F.; Braunder, C.C.; Lima, M.E.; Corrêa, M.N. Metafilaxia com Catosal B12[®] para incrementar o ganho de peso de bezerros durante o início da recria. **A Hora Veterinária**, v. 32, n. 188, p 23-26, 2012.

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

ROLLIN, E.; BERGHAUS, R.D.; RAPNICKI, P.; GODDEN, S.M.; OVERTON, M.W. The effect of injectable butaphosphan and cyanocobalamin on postpartum serum β -hydroxybutyrate, calcium, and phosphorus concentrations in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 978-987, 2010.

SABEUR, K.; BALL, B.A.; Detection of superoxide anion generation by equine spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**, v. 67, p. 701-706, 2006.

SAMPER, J.C. Relationship between the fertility of fresh and frozen stallion semen and semen quality. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 44, p. 107-114, 1991.

SCHMID, E.T.; ESKENAZI, B.; MARCHETTI, F.; YOUNG, S.; WELDON, R.H.; BAUMGARTNER, A.; ANDERSON, D.; WYROBEK, A.J. Micronutrients intake is associated with improved sperm DNA quality in older men. **Fertility and Sterility**, v. 98, n. 5, p. 1130-1137, 2012.

SHARP, A.A.; WITTS, L.J. Seminal vitamin B₁₂ and sterility. **The Lancet**, v. 280, p. 779, 1962.

SHARP, V.; THURSTON, T.M.; FOWKES, R.C.; MICHAEL, A.E. 11 β – Hydroxysteroid dehydrogenase enzymes in the testis and male reproductive tract of the boar (*sus scrofa domestica*) indicate local roles for glucocorticoids in male reproductive physiology. **Reproduction**, v. 134, p. 473-482, 2007.

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

STRADIOLI, G.; RUBEL, M.; ZAMPARINI, M.; TUBARO, F.; VALENTINI, S.; DEGL'INNOCENTI, S.; MONACI, M. Enzymatic evaluation of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) in equine spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 29, 2006.

SUAREZ, S.S. Gamete and zygote transport. **Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)**, v. 1, p. 113-145, 2006.

TOMASZEWSKI, L.; ZMUDZKA, B.; NADWORNÝ, J. Seminal vitamin B12 and sterility. **The Lancet**, p. 281:170, 1963.

TORIBIO R.E. Disorders of calcium and phosphate metabolism in horses. **The Veterinary Clinics of North America, Equine Practice**, v. 27, p. 129–147, 2011.

VAN DER STAAY, F.J.; DE GROOT, J.; VAN REENEN, C.G.; HOVING-BOLINK, A.H.; SCHUURMANN, T.; SCHMIDT, B.H. Effects of Butafosfan on salivary cortisol and behavioral response to social stress in piglets. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 30, p. 410–416, 2007.

VAN GESTEL, R.A.; BREWIS, I.A.; ASHTON, P.R.; HELMS, J.B.; BROWERS, J.F.H.M.; GADELLA, B.M. Capacitation-dependent concentration of lipid rafts in the apical ridge head area of porcine sperm cells. **Molecular Human Reproduction**, v. 11, p. 583-590, 2005.

VAN PELT, A.M.; DE ROOIJ D.G. Retinoic acid is able to reinitiate spermatogenesis in vitamin A-deficient rats and high replicate doses support the full development of spermatogenic cells. **Endocrinology**, v. 128, p. 697-704, 1991.

VARNER, D.D.; JOHNSON, L. In: MCKINNON A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER D.D. (eds). **Equine Reproduction**. 2nd ed. Wiley-Blackwell. 2011, p. 909-990.

VIERTEL, P. Evaluation of clinical efficacy of Catosal B12. **Archiv der Pharmazie**, v. 10, p. 868-874, 1991.

VIJAYARAGHAVAN, S.; HOSKINS, D.D. Regulation of bovine sperm motility and cyclic adenosine 3', 5' monophosphate by adenosine and its analogues. **Biology of Reproduction**, v. 34, p. 468-477, 1986.

VJUGINA, U.; EVANS, J.P. New insights into the molecular basis of mammalian sperm-egg membrane interactions. Review. **Frontiers in Bioscience**, v. 1; n. 13, p. 462-476, 2008.

WADDELL, B.J. Localization of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2 in the male reproductive tract. **Endocrinology**, v. 144: n. 3, p. 101-3106, 2003.

WAGNER, A.; CLAUS, R. Aromatase and 11 β -Hydroxysteroid dehydrogenase 2 localization in the testes of pigs from birth to puberty linked to changes of hormone pattern and testicular morphology. **Reproductive Fertility and Development**; v. 20, p. 505-512, 2008.

WATSON, A. A. Seminal vitamin B₁₂ and sterility. **The Lancet**, ii, p.644, 1962.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**; v. 60, n. 61, p. 481–92, 2000.

WELLS A.L.; LEROY RAYMOND; RALSTON S.L. Mineral intake and hair analysis of horses in Arizona. **Equine Veterinary Science**; v. 10; n. 6, p. 412-416, 1990.

WONG WAI YEE; HANS, M.W.; MERKUS, M.; CHRIS, M.G.; THOMAS; ROELOF MENKVELD; GERHARD, A. ZIELHUIS; REGINE, P. M.; STEEGERS-THEUNISSEN. Effects of folic acid and zinc sulfate on male factor subfertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. **Fertility and Sterility**; v. 77, n. 3, p. 491-497, 2002.