

HENRIQUE THOMAZO FRIAS

**Efeito do desacoplamento mitocondrial na criopreservação de
espermatozoides ovinos**

São Paulo

2022

HENRIQUE THOMAZO FRIAS

Efeito do desacoplamento mitocondrial na criopreservação de espermatozoides ovinos

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcilio Nich

Co-orientador:

Prof. Dr. João Diego de Agostini
Losano

São Paulo
2022

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

4239 FMVZ	Frias, Henrique Thomazo Efeito do desacoplamento mitocondrial na criopreservação de espermatozoides ovinos / Henrique Thomazo Frias. – 2022. 70 f. : il.
	Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2022.
	Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.
	Área de concentração: Reprodução Animal.
	Orientador: Prof. Dr. Marcilio Nichi.
	Coorientador: Prof. Dr. João Diego de Agostini Losano.
	1. Desacoplador. 2. Mitocôndria. 3. Sêmen. 4. Carneiro. 5. Congelamento. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Maria Aparecida Laet, CRB 5673-8, da FMVZ/USP.



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito do desacoplamento mitocondrial na criopreservação de espermatozoides ovinos.", protocolada sob o CEUA nº 2700070219 (ID 006273), sob a responsabilidade de **Marcílio Nichi** e equipe; *Henrique Thomazo Frias* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 07/03/2019.

We certify that the proposal "Effect of mitochondrial uncoupling on ram sperm cryopreservation.", utilizing 6 Ovinos (6 males), protocol number CEUA 2700070219 (ID 006273), under the responsibility of **Marcílio Nichi and team**; *Henrique Thomazo Frias* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 03/07/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [03/2019](#) a [08/2019](#) Área: [Reprodução Animal](#)

Origem: [Biotério do Departamento de Reprodução Animal](#)

Espécie: [Ovinos](#)

sexo: [Machos](#)

idade: [1 a 3 anos](#)

N: [6](#)

Linhagem: [Mestiço](#)

Peso: [30 a 50 kg](#)

Local do experimento: Departamento de Reprodução Animal (VRA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP)

São Paulo, 23 de agosto de 2022

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

São Paulo, 14 de outubro de 2021

CEUA N 2700070219

(ID 008420)

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Marclio Nichi
Área: Reprodução Animal

Título da proposta: "Efeito do desacoplamento mitocondrial na criopreservação de espermatozoides ovinos."

CERTIFICADO (Relatório Parcial versão de 18/maio/2021)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** o Relatório Parcial (versão de 18/maio/2021) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "O experimento encontra-se paralisado devido a pandemia. 1. Qual o estágio do estudo no momento? Resp: As coletas foram interrompidas devido a pandemia COVID-19. 2. Por quanto tempo mais o estudo se estenderá? Resp: 7 meses. Será solicitada uma emenda. 3. Resultados parciais ou totais apresentados em congresso? Resp: Não 4. Resultados parciais ou totais já publicados? Resp: Não".

Comentário da CEUA: Solicitação de prorrogação aprovada para finalização em agosto de 2022.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: FRIAS, Henrique Thomazo

Título: **Efeito do desacoplamento mitocondrial na criopreservação de espermatozoides ovinos**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-
Graduação em Reprodução Animal
da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São
Paulo para a obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.

Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof.

Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof.

Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof.

Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof.

Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus avós, Seu João e Dona Sônia, que foram o início da família maravilhosa que tenho, a quem eu também dedico este trabalho. À minha mãe, que sempre me apoiou e acreditou nos meus sonhos, mesmo quando esses pareciam muito distantes. Ao meu irmão Felipe, pela inspiração para seguir meus objetivos e por todo o apoio nessa jornada. À Isabela, por todo o amor e pela força nos momentos mais difíceis.

*“Speech has allowed the communication of ideas
Enabling human beings to work together to build the impossible
Mankind's greatest achievements have come about by talking
Our greatest hopes could become reality in the future
With the technology at our disposal, the possibilities are unbounded
All we need to do is make sure we keep talking”*

Stephen Hawkin,
Side 3, Pt. 7: Talkin' Hawkin',
The Endless River (2014)
Pink Floyd

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo à FMVZ da Universidade de São Paulo pela oportunidade de vivenciar e aprender ao longo de todos esses anos. Sem dúvidas, é um lugar que eu considero como casa. Obrigado a todos os mestres, funcionários e aos animais, que são os componentes que a tornam uma das melhores do mundo.

Ao querido Prof. Marcilio, por me aceitar desde o estágio obrigatório e pela orientação durante o mestrado, quem sempre me ajudou quando precisei, por todos os ensinamentos e pela inspiração de buscar ainda mais conhecimentos. Muito obrigado!

A todo o time do LA e queridos amigos Ken, Álvaro, Rapha, Bobbie, Fabão, Diego, Giu, Mônica, Dani e Gabi, obrigado pelas risadas, experimentos (e tentativas), churrascos, pela convivência e pelos ensinamentos que tive com cada um de vocês. Também gostaria de agradecer à equipe do BioSptz, Camilla, Larissa, Thais e Professora Mayra, muito obrigado pelo apoio! Agradeço a todos os professores e funcionários do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP e especialmente à Harumi, nosso anjo da guarda da pós graduação. Muito obrigado por toda a disposição e ajuda!

Ao meu querido amigo Ken (“BARBEEEEEEEEEE!”) pela parceria desde a graduação, pelas conversas nas viagens pra Pirassununga, pelas correrias de prazo apertado e por tudo o que desenvolvemos nos últimos anos, saiu até podcast! Tamo junto! Agradeço também à Maite, pela ajuda com a redação e pela amizade.

Agradeço imensamente minha família, que se não fossem vocês eu não teria chegado até aqui. Em especial minha mãe Silmara, pelo exemplo de resiliência e pelo amor, aos meus irmãos Felipe e Márcia e ao Gui, meu sobrinho querido. Às cachorrinhas July, Sol e Luna. Vocês me lembram do porquê eu escolhi esse caminho. Muito obrigado por tudo!

Um agradecimento especial à Isabela por ser minha companheira ao longo dessa jornada, por todo o amor e carinho que você me proporciona, por me fazer acreditar em mim mesmo, pelas risadas e momentos maravilhosos. Muito obrigado, meu amor!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

FRIAS, H. T. **Efeito do desacoplamento mitocondrial no processo de criopreservação de espermatozoides ovinos**. 2022. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

O processo de criopreservação de espermatozoides é uma biotecnologia de grande importância na pecuária brasileira. Porém, essa técnica causa uma diminuição considerável da qualidade espermática, ocorrendo perda de motilidade e aumento de danos nos espermatozoides. Uma das causas desta perda de qualidade é por conta do aumento na quantidade de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), levando a um desbalanço oxidativo espermático, denominado estresse oxidativo. O espermatozoide possui citoplasma reduzido e, conseqüentemente menor quantidades de moléculas antioxidantes, dificultando sua defesa contra as EROs. Além disso, ele carece de mecanismos de reparação celular e uma maior quantidade de ácidos-graxo insaturados em sua membrana, o que predispõe ainda mais essas células aos ataques das EROs. Terapias antioxidantes são uma alternativa para a diminuição do estresse oxidativo durante o processo de criopreservação, porém as EROs também possuem papel fisiológico na maturação dessas células. Portanto uma terapia antioxidante antes do congelamento dessas células apresenta um desafio, já que é necessário encontrar as concentrações ideais de cada molécula antioxidante. Acredita-se que a mitocôndria seja a principal fonte energética do espermatozoide, que possui essas organelas em grande quantidade em sua peça intermediária, sendo essenciais para sua motilidade. Essa produção de energia também leva a produção das EROs. Uma alternativa à terapia antioxidante seria um moderado desacoplamento mitocondrial, diminuindo a produção dessas EROs. Porém, isso também pode causar déficit energético espermático. Pensando nisso, a adição de glicose no meio de criopreservação parece interessante, uma vez que estudos demonstraram que o espermatozoide também obtém energia através da via glicolítica. O objetivo deste estudo foi realizar um moderado desacoplamento mitocondrial espermático com o uso da molécula 2,4-dinitrophenol (DNP) em diferentes concentrações, associando ou não este tratamento com glicose e analisar seus efeitos na funcionalidade, bioenergética e homeostase oxidativa dos espermatozoides ovinos submetidos à criopreservação. Foi observada maior

porcentagem de espermatozoides com baixa atividade e sem atividade mitocondrial em amostras tratadas com 10 μ M de DNP em relação ao controle (0 μ M DNP) na ausência da glicose. Não foram observadas diferenças significativas nos demais atributos espermáticos entre os tratamentos.

Palavras-chave: estresse oxidativo; biotecnologia; terapia mitocondrial; congelamento; sêmen; carneiros; desacoplamento mitocondrial.

ABSTRACT

FRIAS, H. T. **Effect of mitochondrial uncoupling of ram sperm on the cryopreservation process.** 2022. 70 p. Dissertation (Masters in Science) – School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2022.

The cryopreservation of spermatozoa is a biotechnology of great importance in Brazilian livestock. However, this technique worsens sperm quality, with loss of motility and increased damage to sperm cells. One of the main sources of damage is due to increased amounts of Reactive Oxygen Species (ROS) produced in the freezing process, leading to oxidative imbalance in sperm called oxidative stress. Spermatozoa have reduced cytoplasm and, consequently, lower amounts of antioxidant molecules, making it difficult for these cells to inactivate the ROS. In addition, it lacks cellular repair mechanisms and has a greater amount of unsaturated fatty acids in its membrane, which further predisposes these cells to ROS attack. Antioxidant therapies are one strategy to reduce oxidative stress during the cryopreservation process, but ROS also have a physiological role on the maturation of these cells. Therefore, an antioxidant therapy before freezing sperm proves to be complicated, since it is necessary to find the ideal concentrations of each antioxidant molecule. The mitochondria seem to be the main energy source of the spermatozoa, which have these organelles in large quantities in its midpiece portion, and they are essential for its motility. The ATP production can also rise ROS levels. An alternative to the antioxidant therapy would be a moderate mitochondrial uncoupling, regulating the production of the ROS. However, this can also cause sperm energy deficit. With that in mind, the addition of glucose in the cryopreservation medium seems interesting, since studies have shown that sperm can also obtain energy through the glycolytic pathway. The objective of this study was to perform a moderate sperm mitochondrial uncoupling using the molecule 2,4-dinitrophenol (DNP) in different concentrations, associated or not with glucose and to analyze its effects on functionality, bioenergetics and oxidative homeostasis of frozen ram sperm. Higher percentages of spermatozoa with low mitochondrial activity and no mitochondrial activity were observed in samples treated with 10 μ M DNP in comparison with the control group (0 μ M DNP), in the absence of glucose. No significant differences were observed in other sperm attributes between the groups.

Keywords: oxidative stress; biotechnology; mitochondrial therapy; freezing; semen; ram; mitochondrial uncoupling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Delineamento experimental	34
Figura 2 – Gráfico da população de espermatozoides com membrana plasmática íntegra sem estresse oxidativo (%) na concentração de 2,5µM de DNP com e sem glicose	43
Figura 3 - Gráficos dos resultados da avaliação de atividade mitocondrial (DAB) de amostras tratadas com crescentes concentrações de DNP	45
Figura 4 - Gráficos dos resultados da avaliação de atividade mitocondrial (DAB) de amostras tratadas com crescentes concentrações de DNP suplementados com 5mM de Glicose	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados das análises de cinética espermática de amostras seminais de carneiros (N=6) criopreservadas com diferentes concentrações de DNP (C – Controle 0µM de DNP; DNP2,5 – 2,5µm de DNP; DNP5 - 5µM de DNP; DNP10 - 10µm de DNP) sem a suplementação de glicose pós-descongelamento, a 37°C.	40
Tabela 2 - Resultados das análises de cinética espermática de amostras seminais de carneiros (N=6) criopreservadas com diferentes concentrações de DNP suplementadas com 5mM de glicose (CG – Controle 0µM de DNP+5mM de glicose; GDNP2,5 – 2,5µm de DNP+5mM de glicose; GDNP5 - 5µM de DNP+5mM de glicose; GDNP10 - 10µm de DNP+5mM de glicose) pós-descongelamento, a 37°C.....	41
Tabela 3 – Resultados das análises de FITC-PSA em citometria de fluxo de amostras seminais de carneiros (N=6) criopreservadas com diferentes concentrações de DNP (C – Controle 0µM de DNP; DNP2,5 – 2,5µm de DNP; DNP5 - 5µM de DNP; DNP10 - 10µm de DNP) sem a suplementação de glicose pós-descongelamento, após lavagem com Percoll® 30%, a 37°C.	41
Tabela 4 – Resultados das análises de FITC-PSA em citometria de fluxo de amostras seminais de carneiros (N=6) criopreservadas com diferentes concentrações de DNP suplementadas com 5mM de glicose (CG – Controle 0µM de DNP+5mM de glicose; GDNP2,5 – 2,5µm de DNP+5mM de glicose; GDNP5 - 5µM de DNP+5mM de glicose; GDNP10 - 10µm de DNP+5mM de glicose) após lavagem com Percoll® 30%, pós-descongelamento, a 37°C.....	42
Tabela 5 – Resultados da análise com a sonda CellRox Green associada ao iodeto de propídio (PI) de amostras seminais de carneiros (N=6) criopreservadas com diferentes concentrações de DNP (C – Controle 0µM de DNP; DNP2,5 – 2,5µm de DNP; DNP5 - 5µM de DNP; DNP10 - 10µm de DNP) sem a suplementação de glicose pós-descongelamento, após lavagem com Percoll® 30%, a 37°C.	42
Tabela 6 - Resultados das análises da sonda CellRox Green associada ao iodeto de propídio (PI) de amostras seminais de carneiros (N=6) criopreservadas com	

diferentes concentrações de DNP suplementadas com 5mM de glicose (CG – Controle 0µM de DNP+5mM de glicose; GDNP2,5 – 2,5µm de DNP+5mM de glicose; GDNP5 - 5µM de DNP+5mM de glicose; GDNP10 - 10µm de DNP+5mM de glicose) após lavagem com Percoll® 30%, pós-descongelamento, a 37°C.	43
Tabela 7 – Resultados das análises de potencial de membrana mitocondrial através da sonda JC1 de amostras seminais de carneiros (N=6) criopreservadas com diferentes concentrações de DNP (C – Controle 0µM de DNP; DNP2,5 – 2,5µm de DNP; DNP5 - 5µM de DNP; DNP10 - 10µm de DNP) sem a suplementação de glicose pós-descongelamento, após lavagem com Percoll® 30%, a 37°C.	44
Tabela 8 – Resultados das análises de potencial de membrana mitocondrial através da sonda JC1 de amostras seminais de carneiros criopreservadas com diferentes concentrações de DNP suplementadas com 5mM de glicose (CG – Controle 0µM de DNP+5mM de glicose; GDNP2,5 – 2,5µm de DNP+5mM de glicose; GDNP5 - 5µM de DNP+5mM de glicose; GDNP10 - 10µm de DNP+5mM de glicose) pós-descongelamento, após lavagem com Percoll® 30%, a 37°C.	44
Tabela 9 – Resultados das análises dos índices de atividade mitocondrial pelo ensaio DAB de amostras seminais de carneiros (N=6) criopreservadas com diferentes concentrações de DNP (C – Controle 0µM de DNP; DNP2,5 – 2,5µm de DNP; DNP5 - 5µM de DNP; DNP10 - 10µm de DNP) sem a suplementação de glicose pós-descongelamento, a 37°C.....	46
Tabela 10 – Resultados das análises dos índices de atividade mitocondrial pelo ensaio DAB de amostras seminais de carneiros (N=6) criopreservadas com diferentes concentrações de DNP suplementadas com 5mM de glicose (CG – Controle 0µM de DNP+5mM de glicose; GDNP2,5 – 2,5µm de DNP+5mM de glicose; GDNP5 - 5µM de DNP+5mM de glicose; GDNP10 - 10µm de DNP+5mM de glicose) pós-descongelamento, a 37°C.....	46
Tabela 11 - Resultados da análise de integridade de membrana plasmática pela técnica de coloração Eosina/nigrosina; suscetibilidade ao dano de DNA pela técnica SCSA adaptada; suscetibilidade a peroxidação lipídica (TBARS) de amostras seminais de carneiros (N=6) criopreservadas com diferentes concentrações de DNP (C – Controle 0µM de DNP; DNP2,5 – 2,5µm de DNP; DNP5 - 5µM de DNP; DNP10 - 10µm de DNP) sem a suplementação de glicose pós-descongelamento, após lavagem com Percoll® 30%, a 37°C.	48
Tabela 12 - Resultados da análise de integridade de membrana plasmática pela técnica de coloração Eosina/nigrosina; suscetibilidade ao dano de DNA pela técnica SCSA adaptada; suscetibilidade a peroxidação lipídica (TBARS) de amostras seminais de carneiros (N=6) criopreservadas com diferentes concentrações de DNP suplementadas com 5mM de glicose (CG – Controle 0µM de DNP+5mM de glicose; GDNP2,5 – 2,5µm de DNP+5mM de glicose; GDNP5 - 5µM de DNP+5mM de glicose; GDNP10 - 10µm de DNP+5mM de glicose) após lavagem com Percoll® 30%, pós-descongelamento, a 37°C.....	48

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Exemplos de EROs.....	24
Quadro 2 - Localização e função de antioxidantes espermáticos.	26
Quadro 3 – Variáveis analisadas pelo CASA	35

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 Importância das biotecnologias utilizadas na reprodução assistida.....	20
2.2 Biotecnologias aplicadas ao sêmen: criopreservação	21
2.3 Espermatozoides e os efeitos da criopreservação.....	22
2.4 Relação das espécies reativas de oxigênio com o espermatozoide	24
2.5 Terapias antioxidantes no controle do status oxidativo durante a criopreservação	25
2.6 Produção de EROs na mitocôndria e sua prevenção	27
2.7 Efeitos do desacoplamento mitocondrial e produção energética espermática	29
3. HIPÓTESE.....	31
4. OBJETIVO	32
5. MATERIAIS E MÉTODOS	33
5.1 Animais	33
5.2 Coleta e delineamento experimental.....	33
5.3 Criopreservação das amostras	34
5.4 Análises espermáticas	34
5.4.1 Análise da cinética espermática.....	34
5.4.2 Integridade de membrana plasmática	35
5.4.3 Análises por citometria de fluxo	36
5.4.4 Função mitocondrial.....	37
5.4.5 Avaliação da suscetibilidade a peroxidação lipídica (TBARS)	38
5.5 Análise estatística	39
6. RESULTADOS	40
7. DISCUSSÃO.....	49
8. CONCLUSÃO.....	53
9. REFERÊNCIAS.....	53

1. INTRODUÇÃO

A venda de doses de sêmen de touros no Brasil teve um crescimento de 21% entre os anos de 2020 e 2021, atingindo o número de 28.706.330 doses comercializadas para o cliente final, exportação e prestação de serviço em 2021 comparado a 23.705.584 doses em 2020 (ASBIA, 2021), o que indica o aumento do uso de tecnologia nas produções de leite e corte no país.

O comércio dessas doses ao longo de todo o território nacional e a sua exportação só são possíveis devido ao avanço das técnicas de criopreservação espermática, que teve início com a descoberta acidental do glicerol como crioprotetor (POLGE, 1949). No uso das biotecnologias reprodutivas, de uma maneira geral, as células espermáticas passam pelas seguintes etapas após sua coleta: diluição em meio com crioprotetor, refrigeração, envase, congelação, armazenamento e descongelação. Elas causam alterações que podem inviabilizar a habilidade fecundante por conta de mudanças estruturais e funcionais na membrana e no metabolismo dos espermatozoides (HAMMERSTEDT, 1990), que também produzem maiores quantidades de espécies reativas de oxigênio (EROs) conforme o decréscimo da temperatura na etapa de refrigeração do sêmen, levando ao estresse oxidativo (WANG et. al., 1997; CHATTERJEE S., 2001).

As EROs são moléculas reativas intermediárias que são formadas durante o processo de respiração aeróbica, na redução do oxigênio (O_2) em água (H_2O) na mitocôndria (HROUDOVÁ, 2013). Em concentrações baixas e controladas elas são responsáveis por processos fisiológicos espermáticos essenciais para a aquisição da habilidade fecundante dessas células. Em maiores concentrações, são responsáveis por induzir danos às diversas estruturas dos espermatozoides como membrana plasmática (peroxidação lipídica), DNA e aumento de fatores indutores de apoptose (DE LAMIRANDE, 1997; AGARWAL, 2014). Em um cenário de homeostase oxidativa, o espermatozoide possui mecanismos antioxidantes protetores capazes de impedir o aumento da concentração das EROs para níveis patológicos (HENKEL, 2011). Porém, durante a criopreservação, sua capacidade antioxidante é reduzida e suas estruturas ficam mais suscetíveis ao ataque das espécies reativas, resultando em perda de fertilidade e menor capacidade fecundante (BILODEAU, 2000).

Diversos estudos empregaram a suplementação com antioxidantes nos diluidores de sêmen com a finalidade de combater o possível estresse oxidativo, que pode acontecer durante do processo de congelamento, buscando a melhora da qualidade seminal pós descongelamento, porém os resultados são conflitantes (TEN, 1997; DONELLY, 1997; NICHI, 2001; PEÑA, 2003; TAYLOR, 2009; ZHU, 2017). Uma alternativa à terapia antioxidante é atuar na prevenção da formação das EROs. A mitocôndria, presente na peça intermediária dos espermatozoides, é uma importante fonte de energia. Porém, essa organela também é uma importante fonte de EROs, que tem sua produção aumentada em mitocôndrias disfuncionais (WEI et. al, 2001; FEDERICO, 2012). Com isso, o uso de protetores mitocondriais pode ser uma opção interessante para diminuir o estresse oxidativo na criopreservação espermática.

Uma possibilidade de terapia mitocondrial seria realizar um moderado desacoplamento dessas organelas (CUNHA, 2011). O efeito protetor de moléculas desacopladoras foi verificado em estudos de modelos de doenças que têm origem em disfunções mitocondriais e anóxia, com o uso do desacoplador 2,4-dinitrofenol (DNP) (GEISLER, 2019; CALDEIRA, 2008; MINERS, 2000). Esse efeito protetor similarmente foi verificado em espermatozoides de peixes (FANG, 2014) e primatas (DONG, 2010). Apesar do possível efeito protetor dos desacopladores mitocondriais contra danos oxidativos, estas moléculas, por realizarem moderada despolarização mitocondrial, podem ocasionar um déficit energético celular por conta de que uma parte dos prótons adentram a matriz mitocondrial por meios não convencionais (sem produção energética) e não através da ATP sintase (processo onde acontece a fosforilação de uma molécula de ADP, produzindo ATP) (GEISLER, 2011). Sendo assim, uma alternativa seria estimular outra via de obtenção de ATP, como a glicólise (MUKAI, 2004; LOSANO, 2016).

Desta forma, realizar um moderado desacoplamento mitocondrial em espermatozoides de carneiros utilizando o DNP associado à glicose pode ser uma alternativa viável para evitar a produção em excesso das EROs durante a criopreservação, prevenindo danos estruturais nas células, atingindo maior qualidade seminal após o descongelamento e consequente o aumento da capacidade reprodutiva com a utilização de biotecnologias reprodutivas. Para este propósito, é possível a utilização de ejaculados de carneiros como modelo experimental, visto que ainda existem limitações quanto à sua congelabilidade (PERIS-FRAU, 2020).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância das biotecnologias utilizadas na reprodução assistida

A utilização de recursos tecnológicos em reprodução tem buscado diminuir perdas e melhorar as capacidades reprodutivas de humanos e animais sendo que, no caso do segundo, essa missão também tem como objetivo o melhoramento genético (SALVADOR, 2019). O emprego da inseminação artificial em tempo fixo (IATF), maior técnica de inseminação artificial utilizada atualmente em rebanhos nacionais, cresceu nos últimos anos, atingindo a venda de 26.480.025 protocolos em 2021 (BARUSELLI, 2021), acompanhada pelas vendas de doses de sêmen por centrais de inseminação (ASBIA, 2021).

A industrialização da técnica de criopreservação seminal só foi possível pelos avanços científicos desde sua descoberta em 1949, por Polge e colaboradores. O aprimoramento do processo de congelamento do sêmen de diversas espécies (Sztein, 2018) permitiu que animais geneticamente selecionados distribuíssem de uma maneira mais efetiva seus atributos de capacidade reprodutiva superior e preferíveis índices zootécnicos (DOMENICO et. al, 2009), contribuindo para a melhora dos rebanhos, com grande ajuda da inseminação artificial (BARUSELLI, 2019). Além do uso na IATF, o sêmen congelado também é empregado na produção de embriões in vitro (PIV) e na transferência de embriões (TE), que também vêm crescendo em quantidades de embriões produzidos tanto no Brasil como na América do Norte e na Europa (GONÇALVES, 2019). A PIV, acompanhada da TE, conseguem acelerar o ganho genético do rebanho ao utilizar os gametas de progenitores com características desejadas de acordo com os objetivos dos criadores (GOMES, 2021).

O uso dessas biotecnologias facilita o manejo, resultam em produção de lotes mais homogêneos de bezerros (ANDRADE, 2018) e permitem maior eficiência produtiva e reprodutiva (VIZIACK, 2020), sendo possível diminuir a área ocupada por rebanhos, o que é importante por conta do impacto ambiental ocasionado pela criação extensiva e o desmatamento para a instalação de pastagens (IPAM, 2021). Adicionalmente, a adoção da IATF com sêmen criopreservado possibilita que as propriedades diminuam a quantidade de touros utilizados para monta natural, evitando problemas de manejo, reduzindo custos e a área ocupada por esses animais.

Com outro objetivo, muitas dessas biotecnologias são empregadas no estudo da reprodução de animais silvestres para o restabelecimento de populações ameaçadas. Porém, por conta da grande variedade de espécies, que possuem suas particularidades fisiológicas e reprodutivas, maiores dificuldades estão sendo enfrentadas nessa área (GONZALES, 2019). Diferentemente dos objetivos da reprodução animal, a reprodução humana busca a correção de problemas de fertilidade, onde existem evidências do declínio da qualidade seminal ao decorrer das últimas décadas, com o aumento no número de homens e mulheres apresentando subfertilidade (SENGUPTA, 2017; SKAKKEBAEK, 2022). As causas dessa diminuição da fertilidade podem estar além de mudanças comportamentais e econômicas ao longo do tempo, mas também estão relacionadas com o estilo de vida e onde vivem, com regiões industriais apresentando-se particularmente com menores índices de fertilidade (SKAKKEBAEK, 2022). Isso reflete na procura por auxílio de técnicas de reprodução assistida que, desde o primeiro nascimento de um ser humano por fertilização in vitro (FIV) em 1978, cresceu até mais do que o esperado (FADDY, 2018).

2.2 Biotecnologias aplicadas ao sêmen: criopreservação

O congelamento de células espermáticas é uma maneira de preservar o germoplasma por tempo indeterminado, cessando os seus processos celulares e metabólicos de uma maneira que as células recuperem e mantenham sua funcionalidade após o descongelamento (MAZUR, 1984).

Lazzaro Spallanzani (1729-1799) foi um experimentalista italiano que voltou o seu foco para ciência do semen na década de 1770, examinando amostras de mamíferos, anfíbios e peixes onde encontrou os espermatozoides e, posteriormente, sua capacidade de fertilização. Ele também, em 1776, observou que espermatozoides permaneciam viáveis após ficarem na neve e depois serem reaquescidos (Clarke, 2006).

Na história mais recente, em 1949, Chris Polge e colaboradores descobriram por acaso que o glicerol, confundido com uma solução de frutose, permitia a sobrevivência dos espermatozoides após a criopreservação, ainda que sem entender o seu mecanismo de ação (Polge, 2006). Em trabalhos contemporâneos de Polge, escritos em russo, Bernstein e Petropavlovski utilizaram de 0.5 a 3mM de glicerol para

congelar sêmen de touros, coelhos, cachacos, garanhões e carneiros a -21°C (ALI *et al.*, 2017).

Crioprotetores são moléculas com grande afinidade de ligação com H_2O , por conta disso, eles conseguem diminuir seu ponto de congelamento e sua disponibilidade, dificultando e diminuindo a formação de cristais de gelo intracelulares (MANDUMPAL, 2010). Além disso, também são capazes de aumentar a permeabilidade de membranas, facilitando a saída de água presente no citoplasma e sua substituição pelo agente protetor (GURTOVENKO, 2007). Dentre os crioprotetores intracelulares, os mais utilizados são o glicerol, o dimetilsulfóxido (DMSO), o propilenoglicol (PG) e o etilenoglicol (EG). Eles precisam ser altamente solúveis em água em baixas temperaturas, capazes de permear as membranas celulares e apresentar baixa toxicidade (PEGG, 2007).

Além dos crioprotetores intracelulares, outros compostos são importantes na prevenção de danos celulares oriundos do processo de criopreservação. Os diluidores de semen também possuem em sua composição, na maior parte das vezes, um crioprotetor extracelular (geralmente são utilizados gema de ovo ou leite), açúcares (glicose, trealose ou sacarose), sais (ácido cítrico, citrato de sódio) e antibióticos (penicilina ou estreptomicina) (EVANS, 1987). A constituição desses diluidores pode variar de acordo com a espécie, por conta das diferentes características morfológicas e fisiológicas dos espermatozoides entre elas (tamanho de cabeça, forma, volume e dimensão de organelas) (THURSTON, 2001). Também deve-se levar em conta a tolerância à criopreservação, que é distinta entre as espécies e indivíduos (EVANS, 2020 e 2021; PEDROSA *et al.*, 2021).

Apesar do desenvolvimento dessa tecnologia, ainda existem limitações para sua aplicação. Segundo Isachenko, em um estudo publicado em 2003, existe uma perda de até 50% das células espermáticas que são submetidas aos protocolos de congelamento usuais. Esse baixo aproveitamento se dá principalmente pela queda de temperatura, danos osmóticos, formação de cristais de gelo e estresse oxidativo (THOMSON, 2009; NICHI, 2009; WOLKERS, 2021).

2.3 Espermatozoides e os efeitos da criopreservação

Estruturalmente, os espermatozoides são compostos por cabeça (que carrega um núcleo haplóide altamente condensado, cercado de uma fina camada de

citoplasma e acrossoma), peça intermediária (onde reside uma população de mitocôndrias responsáveis pela produção energética) e cauda. Sua membrana plasmática é constituída de uma bicamada de fosfolípidos rica em ácidos graxos poliinsaturados (PUFA), que a concede maior flexibilidade (FLEMING, 1981; CHAVARRÍA 1997) e desempenham um papel fundamental para o metabolismo lipídico, manutenção da motilidade e capacidade de fusão com o oócito dos espermatozoides, além de estarem relacionados com a maior sobrevivência à criopreservação e maior fertilidade (KELSO et. al, 1997; VAN TRAN, 2017).

Os testículos de muitas espécies de mamíferos residem na bolsa escrotal localizada, fora do abdômen, com a temperatura de 2 a 6°C menor do que a corporal (que giram em torno de 38°C) para garantir que a espermatogênese aconteça apropriadamente (WAITES, 1970). Em protocolos de criopreservação espermatozoides ovinos coleta-se o ejaculado que é diluído em meio específico para sêmen, dividido em alíquotas que são envasadas a 37°C e inicia-se o processo de refrigeração até 4°C, onde as palhetas são então colocadas no vapor de nitrogênio para em seguida serem mergulhadas em nitrogênio líquido, onde podem ser armazenadas por tempo indefinido a -196°C (BATISSACO, 2014).

Apesar de permitir a manutenção da viabilidade dessas células por longos períodos de tempo em baixas temperaturas, esse processo por qual elas passam pode causar danos aos espermatozoides (HEZAVEHEI, 2018). A diminuição da fluidez e da integridade da membrana plasmática por mudança do arranjo dos fosfolípidos foi observada em amostras seminais criopreservadas de carneiros (HINKOVSKA-GALCHEVA, 1989). A desintegração do acrossoma e o descolamento parcial da membrana acrossomal está relacionada com os efeitos físicos do congelamento (BARTHELEMY, 1990). Por conta da formação de gelo extracelular, as células são submetidas a um grande estresse osmótico que causa sua desidratação, podendo levar à morte celular (WOLKERS et. al, 2007). O congelamento afeta a expressão de genes relacionados à fertilidade, na expressão de proteínas espermáticas e mitocondriais associadas à viabilidade, motilidade e integridade acrossomal (HEZAVEHEI, 2018).

A queda de temperatura no processo de congelamento do sêmen pode causar um aumento significativo das espécies reativas de oxigênio (WANG, 1997; KIM, 2011). Quando em desequilíbrio oxidativo, elas são responsáveis por causar a peroxidação lipídica de membranas (DURU et. al, 2000), quebras de DNA

espermático (TWIGG, 1998) e maior índice de apoptose precoce de células espermáticas (MOHAMED et. al, 2004), diminuindo o potencial de fertilização do sêmen (DUTTA, 2019).

2.4 Relação das espécies reativas de oxigênio com o espermatozoide

Embora as EROs sejam agentes responsáveis por avarias às estruturas das células espermáticas, as mesmas possuem papel fisiológico em quantidades controladas. Aitken e colaboradores, em 1989, observaram que a peroxidação lipídica melhorou a capacidade de ligação à zona pelúcida do espermatozoide humano, levantando a hipótese que esse tipo de injúria poderia regular algumas funções dessas células. De fato, estudos posteriores confirmaram que a ação dos radicais ativa cascatas de sinalização intracelular que resultam na aquisição da capacidade fertilizante, como maturação, hiperativação, reação acrossômica e capacitação (THOMPSON, 2013; AGARWAL, 2012; DU PLESSIS, 2015).

Os radicais livres (alguns exemplificados no Quadro 2) são moléculas intermediárias que possuem um ou mais elétrons não pareados em sua última camada, são altamente reativas e oxidam lipídios, aminoácidos e carboidratos, além de serem responsáveis por causar danos ao DNA (SANOCKA, 2004). Um desses radicais, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), em altas concentrações, resultou na perda de funções essenciais para a fertilização, afetando a motilidade e a capacidade de ligação à zona pelúcida (Oehninger, 1995).

Quadro 1 - exemplos de EROs

ERO	Estrutura química
Óxido nítrico	NO•
Peroxinitrito	ONOO-
Ânion superóxido	O ₂ •-
Peróxido de hidrogênio	H ₂ O ₂
Radical hidroxila	OH•

Fonte: (Kowalczyk, 2022.)

Leucócitos e espermatozoides morfologicamente anormais parecem ser as principais fontes de EROs em ejaculados (AITKEN, 1995), com destaque para as células espermáticas que apresentam gota citoplasmática residual (ZINI, 2000). Além disso, mitocôndrias disfuncionais também são importantes produtoras de EROs (MARCHETTI, 2002). Uma vez que a peça intermediária dos espermatozoides possui alta quantidade dessas organelas, os radicais atacam as membranas das mitocôndrias ao redor que, ao serem estressadas, aumentam sua produção de EROs, estabelecendo-se um ciclo que se retroalimenta, piorando o status oxidativo (SABETI, 2016). Por serem ricas em PUFAs, as membranas das células espermáticas são mais suscetíveis ao ataque das EROs ocorrendo a peroxidação lipídica, que é um processo em que o radical sequestra elétrons dos lipídios, produzindo outros radicais intermediários que além de danificar DNA, proteínas e diminuírem a atividade enzimática, ativa cascatas de processos apoptóticos e morte celular (ŁUCZAJ, 2017; SU et. al, 2019).

Os espermatozoides possuem mecanismos antioxidantes desenvolvidos durante a espermatogênese para neutralizar as EROs e garantir a sua proteção contra o estresse oxidativo (MENNELLA, 1980; TRAMER, 1998). Todavia, sua quantidade é limitada pelo fato que a célula espermática possui pouco citoplasma, contendo baixas quantidades de enzimas capazes de neutralizar as EROs (CORTADELLAS, 1994). Porém, o líquido seminal produzido pelas glândulas anexas que se mistura aos espermatozoides durante a ejaculação é rico em antioxidantes que auxiliam na proteção contra o estresse oxidativo, tem função nutricional celular e desempenha um papel importante no trato reprodutivo da fêmea nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário (BROMFIELD, 2014).

2.5 Terapias antioxidantes no controle do status oxidativo durante a criopreservação

Moléculas antioxidantes podem neutralizar um radical livre doando ou recebendo elétrons dos agentes oxidantes, resultando na destruição direta ou transformação em um novo radical menos reativo (LÜ, 2010).

Visto que o processo de congelamento do sêmen propicia um aumento na produção de EROs e os mecanismos de defesa das células espermáticas são limitados, diversos estudos buscaram combater o estresse oxidativo adicionando antioxidantes aos diluidores de sêmen com o objetivo de obter uma melhor qualidade

seminal após o descongelamento (AMIDI, 2016), sendo os antioxidantes classificados como enzimáticos (superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase) e não enzimáticos (coenzima Q10, selênio, carnitina, vitaminas C e E, entre outros) (KOWALCZYK, 2022). Alguns deles, suas localizações e funções estão retratadas no Quadro 2.

Quadro 2 - Localização e função de antioxidantes espermáticos.

Antioxidante	Localização	Função
Glutathiona	Tiol não-proteico na célula	Neutraliza radicais livres
Carotenóides	Antioxidante lipídico solúvel em membranas	Manutenção da integridade celular; regulação da espermatogênese e proliferação de células epiteliais
Vitamina E	Majoritariamente em membranas	Detoxificação de produtos da peroxidação lipídica de membranas
Vitamina C	Citosol, cloroplasto, mitocôndria, peroxissomo, vacúolos	Detoxificação de H ₂ O ₂ .
Superóxido dismutase (SOD)	Todas as células eucarióticas	Catalisa a dismutação do O ₂ ^{•-} em O ₂ e H ₂ O ₂
Catalase	Organelas intracelulares, peroxissomos	Diminui os níveis de H ₂ O ₂
Glutathiona peroxidase (GPX)	Citoplasma, matriz mitocondrial	Diminui os níveis de H ₂ O ₂

Fonte: Frias, 2022, adaptado de Kowalczyk, 2022.

Riesco e colaboradores reportaram melhora na qualidade seminal pós descongelamento de espermatozoides ovinos e aumento de fertilidade dessas amostras suplementando o meio diluidor com 1mM de Vitamina E, em 2021. As quantidades de EROs foram significativamente menores em humanos quando o meio utilizado continha catalase e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), com menor fragmentação de DNA porém sem redução da peroxidação lipídica (CHI, 2008). Em cães, os espermatozoides mostraram melhores parâmetros de motilidade em

alíquotas tratadas com antioxidantes, com destaque para a catalase, mas não houve redução de EROs (MICHAEL, 2007). A melatonina é uma molécula com propriedades antioxidantes que já foi testada para a criopreservação de sêmen de diversas espécies, e estudos demonstraram que ela apesar de conseguir melhorar a qualidade de espermatozoides após serem reaquecidos, esse efeito é dose-dependente para cada espécie (MEDRANO, 2017). Vitamina C diminuiu significativamente danos de DNA em células espermáticas de ratos (TOGHIANI, 2018). Por outro lado, existem estudos em que a adição desses antioxidantes não resultou em melhora, como DONNELLY, em 1999, que observou piora nos parâmetros de motilidade utilizando Vitamina C em espermatozoides humanos in vitro. O emprego da glutathione (GSH) em sêmen de cães, apesar de proteger o acrossoma, em concentrações maiores causou danos espermáticos e diminuição da atividade mitocondrial (LUCIO, 2016).

Esses estudos demonstram o potencial da terapia antioxidante contra as EROs e no auxílio da manutenção da homeostase oxidativa de espermatozoides de diversas espécies durante o processamento do ejaculado, mas também mostram que nem sempre traz apenas benefícios, levando em consideração que os radicais possuem funções fisiológicas (como demonstrado por Du Plessis, em 2015). Portanto, uma terapia antioxidante necessita de antioxidantes específicos em doses adequadas para ter-se o efeito desejado com a sua utilização (NICHII, 2009).

2.6 Produção de EROs na mitocôndria e sua prevenção

Como os tratamentos clássicos com antioxidantes buscam combater as EROs já formadas, mitigando o estresse oxidativo, outra perspectiva seria tentar impedir que esses radicais livres sejam gerados. Uma das principais fontes de EROs espermática é a mitocôndria (KOPPERS, 2008). Os radicais são intermediários de reações que acontecem na cadeia de transporte de elétrons durante a produção de energia, com a fosforilação de uma molécula de ADP em ATP. As EROs mitocondriais possuem função sinalizadora e desencadeiam respostas celulares tanto positivas quanto negativas dependendo da sua quantidade no citosol, regulada pelo sistema redox dessas organelas (ZOROV, 2014), que parece ser de suma importância para a manutenção da homeostase mitocondrial (Hansen, 2006).

Um conjunto de proteínas transmembranas (complexos I-IV) formam a cadeia transportadora de elétrons (CDE) e, juntamente com a ATP sintase (complexo V) são

a base de produção de ATP durante a fosforilação oxidativa. Substratos oxidáveis entregam elétrons que passam através dos complexos em um processo exergônico, conduzindo ao bombeamento de prótons para o espaço intermembranar pelos complexos I, III e IV, o que leva a um gradiente eletrolítico que ativa a síntese de ATP pelo complexo V (ZHAO, 2019). Durante esse processo, antes de chegarem no complexo IV, pode ocorrer o vazamento desses elétrons que reagem com moléculas de oxigênio na CTE, levando a formação do ânion superóxido nos complexos I, III e IV ao invés da produção de uma molécula de água. Esse ânion então sofre dismutação pela SOD, resultando em oxigênio e peróxido de hidrogênio que, em reação com Fe^{2+} , produz o radical hidroxila (LAMBERT, 2009).

Apesar de ocorrer fisiologicamente em diversos tipos celulares, a produção de EROs é maior em mitocôndrias disfuncionais e pode levar à morte celular pela ativação de cascatas apoptóticas, que buscam proteger o sistema dos possíveis danos oxidativos (JEŽEK, 2018). Estudos observaram que a criopreservação de gametas de diversas espécies induz alterações ou danos à mitocôndria, tornando-as uma importante fonte de EROs responsáveis pelo estresse oxidativo, diminuindo a qualidade dessas amostras (O'CONNELL, 2002; FIGUEROA, 2017).

Uma estratégia para a diminuir a produção de EROs mitocondriais é o desacoplamento. As UCPs são proteínas desacopladoras transmembrana presentes nas mitocôndrias que regulam a passagem de prótons através da membrana mitocondrial que ocorre para a atividade da ATP sintase (que, ao jogar H^+ para a matriz, fosforila uma molécula de ADP produzindo ATP). A entrada desses prótons que não seja por meio da ATP sintase, como as UCPs, ao invés de ocorrer a produção de ATP, esse potencial é disperso em forma de calor (DEMINE, 2019). Isso também resulta na diminuição do potencial de membrana mitocondrial (PMM), favorecendo os complexos I, III e IV da cadeia de transporte de elétrons que tentam restabelecer o PMM bombeando esses prótons de volta para o espaço intermembranas, consequentemente acelerando esse transporte de elétrons pela CTE, o que diminui o escape desses elétrons e aumenta o consumo de oxigênio na matriz mitocondrial, o que acarreta na diminuição da formação de radicais livres (como o O_2^-). Além dessas proteínas inerentes na membrana interna da organela é possível atingir esse objetivo com o uso de desacopladores químicos (CADENAS, 2018; BERRY, 2018).

2.7 Efeitos do desacoplamento mitocondrial e produção energética espermática

O desacoplamento é um processo fisiológico que pode ter um papel protetor na manutenção da homeostase oxidativa das mitocôndrias. Grande parte dessas moléculas desacopladoras possuem ação protonófora, são hidrofóbicas e caracterizadas como ácidos fracos. Elas adentram a matriz mitocondrial carregando um próton (H^+) que é então dissociado, diminuindo o PMM que é mantido pelo gradiente de prótons (TERADA, 1990).

Os desacopladores inerentes dessa organela (UCPs) conseguem atenuar o dano oxidativo causado pelas EROs regulando a CTE em diversos órgãos humanos e, quando estimulados, podem diminuir ainda mais a produção desses radicais desde que existam substratos para a atividade dos complexos I e II ($NADH_2$ e $FADH_2$, respectivamente) (AHMAD, 2021; LEDESMA, 2002). Além desses UCPs, também é possível realizar esse desacoplamento com moléculas como o 2,4 dinitrofenol (DNP) e o FCCP. Eles tiveram efeitos cardioprotetores quando utilizados em baixas concentrações em ratos (CLOSE et. al, 2006; MINNERS et. al, 2000). No protocolo de criopreservação de células hepáticas, quando na presença de DNP, houve uma diminuição da peroxidação lipídica e diminuição parcial na produção de ATP, que foi retomada aos níveis fisiológicos após a lavagem, sugerindo que um desacoplamento mitocondrial moderado pode levar à melhora da qualidade dessas células durante a criopreservação (PRETENKO, 2010). Em um estudo de 2006, Jonathan P. e colaboradores constataram o efeito protetor do FCCP na recuperação funcional após isquemia em células cardíacas de ratos, pela diminuição na produção dos radicais, além de ação regulatória das cascatas de sinalização de apoptose.

Em espermatozoides de peixes, o tratamento com DNP resultou na queda da produção de EROs, da peroxidação lipídica e foi observado um aumento da motilidade dessas células após o descongelamento (LU, 2014). Outro estudo em 2010 relatou aumento da motilidade de células espermáticas de primatas em amostras tratadas com DNP, sugerindo que seu uso em espécies que possuem baixa criotolerância possa melhorar a qualidade dos espermatozoides quando reaquecidos (DONG, 2010). Do mesmo modo que outros desacopladores químicos, o DNP é uma molécula levemente ácida que atua carregando H^+ para a matriz mitocondrial contornando a atividade da ATP sintase. Após entrada do DNP em sua forma protonada (ligado a um H^+), o próton é dissociado e o desacoplador volta para o

espaço intermembrana em sua forma desprotonada, para agora, em um meio levemente ácido, reprotonar com um H^+ e adentrar para a matriz mitocondrial novamente, de forma cíclica (GEISLER, 2019).

Os efeitos imediatos do DNP são a diminuição do PMM, o que reduz a produção de EROs e, em seguida, o fechamento do canal uniporter mitocondrial, diminuindo o influxo de cálcio (PANDYA, 2007; LIU *et al.*, 2015). Isso impede que a mitocôndria ultrapasse sua capacidade de armazenamento de Ca^{2+} que, em caso de sobrecarga, ocorre a formação do poro de transição de permeabilidade mitocondrial (mPTP) e as organelas são destruídas, liberando fatores pró apoptóticos afetando as mitocôndrias ao seu redor em um efeito cascata (AON, 2004; CHALMERS, 2003). Por conta da diminuição momentânea do PMM com a entrada do desacoplador, essa terapia pode prejudicar inicialmente a ação da ATP sintase por conta do menor gradiente de prótons, diminuindo produção de ATP e aumentando a disponibilidade de ADP. A enzima fosfofrutoquinase (PFK) é responsável pela fosforilação da frutose-6-fosfato para frutose-1,6-bifosfato na glicólise e é regulada pela proporção de ATP e ADP disponíveis. Sua atividade é retomada quando a concentração de ATP diminui e os de ADP aumentam, sucedendo um maior metabolismo de glicose (HALEY, 2021) e também o de lipídios (beta-oxidação) para a produção de ATP, NADH e FADH₂ através do ciclo do ácido cítrico (AKRAM, 2014) na tentativa de restaurar os níveis adequados de PMM e regularizar os estoques de ATP e sua produção pela fosforilação oxidativa (GEISLER, 2011).

Outro método de obtenção de energia importante para o espermatozoide de diversas espécies é a glicólise (MUKAI, 2004; FORD, 2006; FERRAMOSCA, 2014). No contexto do tratamento com um desacoplador mitocondrial, onde pode acontecer um déficit de ATP, a suplementação com substratos para a glicólise como piruvato (SILVA *et al.*, 2009; SATTAR, 2018), glicose e frutose (YILDIZ, 2000; PONGLOWHAPAN, 2004) pode ser uma estratégia interessante para auxiliar na manutenção da homeostase energética. Nesse âmbito, Losano e colaboradores demonstraram a importância da glicólise e os efeitos do desacoplamento mitocondrial nas características funcionais de espermatozoides de carneiros (LOSANO *et al.*, 2017). O ciclo do ácido cítrico é capaz de fornecer, além de ATP, substratos (FADH₂ e NADH) para a cadeia transportadora de elétrons, onde complexos I e II utilizam esses substratos para bombear prótons de volta para o espaço intermembrana como uma possível resposta à ação do desacoplador (MARTÍNEZ, 2020).

3. HIPÓTESE

O tratamento de amostras espermáticas de carneiros com o desacoplador mitocondrial 2,4-dinitrofenol (DNP), no protocolo de criopreservação, melhora a qualidade dos espermatozoides pós-descongelamento por meio da prevenção da liberação excessiva de espécies reativas de oxigênio pelas mitocôndrias. Ademais, a estimulação da via glicolítica por meio da adição de glicose, é capaz de suprir o déficit energético causado pelo desacoplamento mitocondrial durante o processo de criopreservação.

4. OBJETIVO

Realizar um moderado desacoplamento mitocondrial com crescentes concentrações de DNP, suplementados ou não com glicose, e avaliar seus efeitos na funcionalidade, bioenergética e status oxidativo de espermatozoides ovinos no processo de criopreservação.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

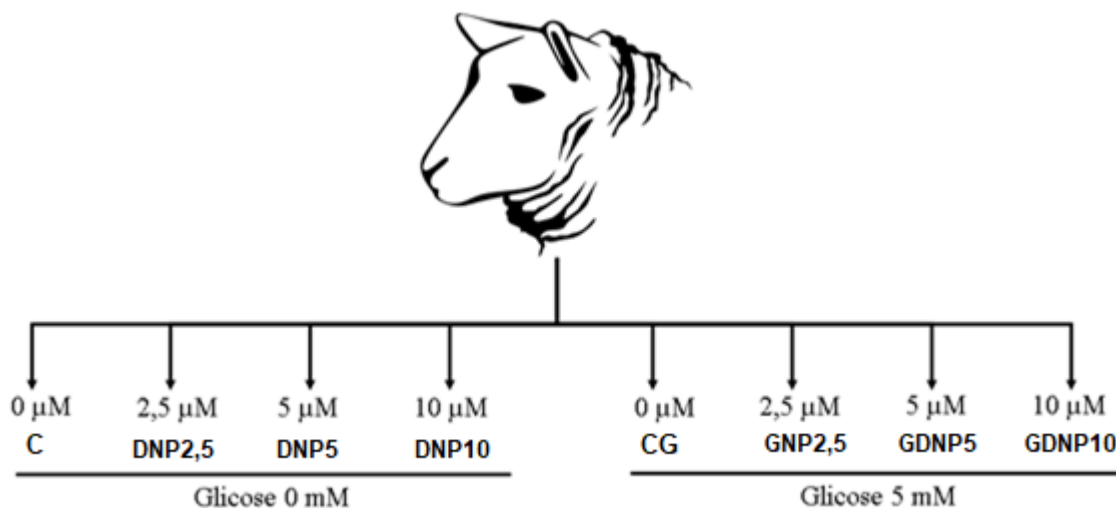
5.1 Animais

Foram utilizados seis carneiros adultos, com idade entre 5 e 6 anos, sexualmente maduros, hígidos, previamente condicionados para coleta com vagina artificial, alojados nas baias coletivas cobertas do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo em São Paulo - SP, com regime de alimentação composto por ração comercial para ovinos e feno, com água *ad libitum*. O experimento foi autorizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FMVZ-USP, registrado sob o N° 2700070219.

5.2 Coleta e delineamento experimental

Ejaculados de seis carneiros hígidos (N=6) foram coletados em tubos Falcon de 50mL com a utilização de vagina artificial. Após a coleta, os ejaculados foram mantidos em banho-maria à 37°C e diluídos a uma concentração final de 100×10^6 espermatozoides por mL com o diluidor de sêmen comercial OptiXcell® (IMV Technologies, Brasil). Os ejaculados diluídos foram então divididos em alíquotas de 1500 µL de uma maneira que foram formados os seguintes grupos: Controle (amostra seminal não tratada - C), Controle Glicose (adição de 5 mM de glicose - CG), DNP (amostras tratadas com concentrações crescentes do desacoplador mitocondrial 2,4-dinitrophenol; DNP2,5– 2,5 µM, DNP5 – 5 µM e DNP10 - 10 µM) e DNP com adição de 5 mM glicose (GDNP2,5 – 2,5 µM, GDNP5 – 5 µM e GDNP10 - 10 µM), conforme ilustrado na Figura 1.

Figura 1 - Delineamento experimental



Fonte: Frias (2022).

5.3 Criopreservação das amostras

Imediatamente após os tratamentos, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,5 mL e levadas à geladeira, onde permaneceram por cerca de 120 minutos até atingirem 4°C. Em seguida, as palhetas foram posicionadas 3 centímetros acima do nitrogênio líquido por 15 minutos. Após este período, as palhetas foram submersas nesse nitrogênio líquido, raqueadas e armazenadas em botijão de nitrogênio até a descongelação. As palhetas foram descongeladas a 37°C por 30 segundos para a realização das análises espermáticas. As amostras foram submetidas à lavagem para a retirada do diluidor que consistiu em centrifugação durante 5 minutos à 6600G em um meio com gradiente de 30% de Percoll® (Sigma-Aldrich, USA), com exceção das amostras utilizadas para as análises de cinética e de atividade mitocondrial.

5.4 Análises espermáticas

5.4.1 Análise da cinética espermática

Após serem descongeladas, as amostras foram analisadas quanto à cinética espermática com o uso do CASA (Computer Assisted Sperm Analysis; Hamilton-Thorne®, Ivos 12.3, USA) no *setup* para carneiros do equipamento. Para isso, em uma lâmina de vidro pré aquecida a 37°C, foram pipetados 10 μ L de cada amostra e cobertos com uma lamínula de vidro, também a 37°C, para serem analisadas pelo

CASA. Para cada amostra, foram contabilizadas pelo menos 1000 células e de 5 a 7 números de campos contados. Foram mensuradas as seguintes características de motilidade: VAP (velocidade média de percurso, em $\mu\text{m/s}$), VSL (velocidade retilínea, $\mu\text{m/s}$) VCL (velocidade curvilínea, $\mu\text{m/s}$); ALH (amplitude do movimento lateral da cabeça, μm); BCF (frequência de batimento cruzado, Hz); STR (retilinearidade) e LIN (linearidade), ambas em %.

Quadro 3 – Variáveis analisadas pelo CASA

Variável	Terminologia	Significado
VAP	Velocidade média de percurso ($\mu\text{m/s}$)	Velocidade média do espermatozóide considerando-se um caminho suavizado.
VSL	Velocidade retilínea ($\mu\text{m/s}$)	Distância mínima que o espermatozóide percorre durante o tempo entre duas avaliações (<i>scans</i>).
VCL	Velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s}$)	Média da velocidade espermática medida através do percurso real percorrido.
ALH	Amplitude do movimento lateral da cabeça (μm)	Comprimento médio da oscilação da cabeça do espermatozóide
BCF	Frequência de batimento cruzado (Hz)	Frequência do movimento lateral, que faz com que a cabeça do espermatozóide cruze o percurso em ambas as direções.
STR	Retilinearidade (VSL/VAP, %)	Qualidade do movimento retilíneo suavizado percorrido.
LIN	Linearidade (VSL/VCL, %)	Qualidade do movimento retilíneo real percorrido.
MOT	- Motilidade (%)	Porcentagem de células móveis.
PROG	- Motilidade progressiva (%)	Porcentagem de células com motilidade progressiva.

Fonte: Frias, 2022, adaptado de Goovaerts et al., 2006.

5.4.2 Integridade de membrana plasmática

A avaliação da integridade de membrana plasmática foi realizada através da técnica de coloração Eosina/Nigrosina. Nesta técnica, os espermatozóides com lesões ou alterações de permeabilidade de membrana são corados em rosa, o que indica a entrada do corante através da membrana lesionada enquanto os

espermatozoides íntegros não são corados, apresentando a coloração branca em contraste com a coloração de fundo da Nigrosina (BARTH et al., 1989). Foram adicionados 5µL do corante em 5µL de amostra em uma lâmina pré-aquecida a 37°C, realizando o esfregaço, respeitando o tempo de incubação de 30 segundos. As lâminas foram avaliadas em microscopia convencional em um aumento de 1000x sob óleo de imersão, sendo contadas 100 células por amostra e classificadas em íntegras e lesionadas, resultado expresso em porcentagem de células com a membrana plasmática íntegra.

5.4.3 Análises por citometria de fluxo

As análises foram realizadas no citômetro de fluxo Guava EasyCyte™ Mini System (Guava Technologies) do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Para avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal, cerca de 2 milhões de espermatozoides foram diluídos em meio TALP sêmen (Modified Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate) e avaliados por citometria de fluxo Guava EasyCyte®. As sondas de iodeto de propídeo (PI 0,5% mg/ml, 0,9% NaCl) e pisum sativum conjugada ao isotilcianetode fluoresceína (FITC-PSA 100µg/ml, azida sódica 10% m/v, DPBS q.s.p. 20ml) foram adicionadas na mesma amostra seminal, obtendo-se assim o resultado combinado entre integridade das membranas plasmática e acrossomal, da mesma população de células, conforme Celeghini et al. (2007). Desta maneira quatro populações foram formadas: espermatozoides com acrossoma íntegro e membrana plasmática íntegra (AIMI), espermatozoides com acrossoma íntegro e membrana plasmática lesionada (AIML), espermatozoides com acrossoma lesionado e membrana plasmática íntegra (ALMI) e espermatozoides com acrossoma lesionado e membrana plasmática lesionada (ALML).

O potencial de membrana mitocondrial foi avaliado por meio da sonda fluorescente JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetrakis(1,2,3,4-tetraethylbenzimidazolyl)carbocyanine chloride; Invitrogen, Eugene, OR, USA), utilizando citômetro de fluxo (Guava EasyCyte™ Mini System, Guava® Technologies, 190 Hayward, CA, E.U.A.). Para realizar esta técnica, 187.500 espermatozoides foram adicionados a 0,5µL de JC-1 (76.5mM) e incubados a 37°C durante 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram classificadas em porcentagem de células com alto

(JC-1 alto), intermediário (JC-1 intermediário) e baixo potencial de membrana mitocondrial (JC-1 baixo).

As detecções das espécies reativas de oxigênio foram realizadas por meio das sondas fluorescentes CellRox® green e DCFH (Molecular Probes, Eugene, OR, E.U.A.). Esta sonda fluorescente penetra na célula e, quando oxidada por EROs intracelulares, se liga ao DNA emitindo uma fluorescência verde mais intensa. Para realizar este procedimento, 187.500 células foram incubadas com a sonda CellRox® green, em uma concentração de 5µM, a 37°C durante 30 minutos e, 10 minutos anteriormente aos 30 minutos a sonda IP será adicionada a uma concentração final de 6µM. As amostras foram analisadas por meio da técnica de citometria de fluxo, excitadas a 488nm e detectadas a 630-650nm para a sonda IP e 515-530 para a sonda CellRox® green. Para a análise dos dados, foram selecionadas as populações de células com membrana plasmática íntegra e com detecção de altos níveis de espécies reativas de oxigênio (PI- e CellROX+).

O teste utilizado para avaliação da integridade de DNA foi o ensaio da estrutura da cromatina espermática (SCSA), onde a amostra é submetida a um desafio ácido, pelo qual é possível avaliar a susceptibilidade da cromatina a desnaturação ácida (EVENSON et al., 1999).

Para isso, uma alíquota de sêmen foi diluída em tampão TNE na concentração de 2×10^6 células/mL. Um volume de 0,1 mL da diluição foi incubado com 0,2 ml de solução detergente (1% de Triton X-100) por 30 segundos para permitir o acesso da laranja de acridina ao DNA espermático. Após este período o sêmen foi incubado com 0,6ml de solução de laranja de acridina (6µg/ml). As amostras foram analisadas utilizando o citômetro de fluxo Guava EasyCyte®, com excitação de 488 nm e 15 mW.

A avaliação da laranja de acridina foi feita baseada na diferença entre a fluorescência emitida pelos espermatozóides com DNA íntegro (dupla fita), que emitem fluorescência verde e os com DNA fragmentado (fita simples), que emitem fluorescência vermelha.

5.4.4 Função mitocondrial

Para a avaliação da função mitocondrial, foi empregada a técnica citoquímica que utiliza o reagente 3'3 Diaminobenzidina (DAB), onde o mesmo é oxidado pela

enzima citocromo c-oxidase, formando um complexo de coloração marrom que se deposita na matriz mitocondrial de mitocôndrias ativas (Hrudka, 1987). Após o descongelamento, uma alíquota de 20µL de amostra de cada tratamento foi incubada com 20µL de DAB em um tubo de microcentrífuga âmbar por 1 hora em banho-maria a 37°C. Após essa incubação, foi realizado um esfregaço em lâminas de microscopia em local protegido de luz e, após secagem, fixadas em formaldeído 10% por 10 minutos. A leitura foi realizada em microscopia de contraste de fase em aumento de 1000x sob óleo de imersão. Foram contadas 200 células, sendo elas classificadas em 4 classes de acordo com a porcentagem de mitocôndrias coradas em marrom (ativas). A classificação foi a seguinte: alta atividade mitocondrial (Classe I), intermediária (Classe II), baixa (Classe III) e ausência de atividade mitocondrial (Classe IV).

5.4.5 Avaliação da suscetibilidade a peroxidação lipídica (TBARS)

O teste à susceptibilidade a peroxidação lipídica foi realizado pelo método de ensaio TBARS (OHKAWA, 1979) induzindo-se a peroxidação lipídica, com a incubação de 200µL de cada amostra com 50µL de ácido ascórbico (concentração 20mM) e sulfato de ferro (concentração 4mM), em tubos de microcentrífuga com tampa aberta em banho-seco a 37°C, durante 90 minutos. Após a indução, foram adicionados 600µL de ácido tricloroacético 10% (TCA 10%) à 5°C às amostras para cessar a reação. Então, os tubos foram centrifugados na capacidade máxima de rotação da centrífuga durante 15 minutos a 5°C, precipitando proteínas e debris, e 800 µL de sobrenadante foi recuperado e transferido para criotubos, onde 800 µL de ácido tiobarbitúrico 1% (TBA 1%) foi adicionado. Após essa etapa, os criotubos foram submetidos a temperatura de 95°C em banho-maria durante 15 minutos, promovendo a reação entre moléculas de malondialdeído (subproduto da peroxidação lipídica) e TBA, sendo imersos em gelo em seguida para a interrupção da reação. Após essa indução, a reação do malondialdeído com o TBA produz uma coloração rósea, que será quantificada em espectrofotômetro (Ultrospec 3300 PRO®, Amersham Biosciences, EUA), com comprimento de onda de 532nm.

5.5 Análise estatística

Os dados foram analisados através do programa SAS System for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, E.U.A.), previamente testados para normalidade de resíduos e homogeneidade das variâncias através do *SAS Guided Data Analysis* e transformados quando necessário. Foi realizada análise de variância (ANOVA) utilizando o teste LSD para a comparação de grupos, considerando o nível de significância de 5% e os resultados foram expressos em média e erro padrão da média.

6. RESULTADOS

Nos parâmetros de motilidade dos espermatozoides não foi observado diferença entre os grupos. Também não foi observado o efeito da glicose na presença e ausência do desacoplador mitocondrial nos valores de cinética espermática avaliados pelo CASA. Os resultados da avaliação de cinética espermática pelo CASA nas diferentes concentrações de DNP com ou sem glicose estão representados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Resultados das análises de cinética espermática de amostras seminais de carneiros (N=6) criopreservadas com diferentes concentrações de DNP (C – Controle 0 μ M de DNP; DNP2,5 – 2,5 μ M de DNP; DNP5 - 5 μ M de DNP; DNP10 - 10 μ M de DNP) sem a suplementação de glicose pós-descongelamento, a 37°C.

Variável	C	DNP2,5	DNP5	DNP10
Motilidade (%)	42,14 \pm 6,49	39,14 \pm 9,25	32,71 \pm 4,61	42,71 \pm 10,33
Motilidade progressiva (%)	8,71 \pm 1,55	6,43 \pm 1,69	6,00 \pm 0,98	6,71 \pm 1,85
Velocidade rápida (%)	25,29 \pm 3,58	20,86 \pm 4,56	19,14 \pm 2,57	23,71 \pm 5,61
Velocidade média (%)	16,71 \pm 3,53	18,43 \pm 5,41	13,71 \pm 2,76	18,86 \pm 5,14
Velocidade lenta (%)	22,43 \pm 3,23	18,14 \pm 4,23	24,86 \pm 3,67	21,29 \pm 3,83
Estáticos (%)	35,57 \pm 7,83	42,86 \pm 10,45	42,14 \pm 6,83	36,00 \pm 9,76
Retilinearidade (%)	63,71 \pm 1,58	60,57 \pm 1,95	60,57 \pm 1,86	60,71 \pm 2,17
Linearidade (%)	44,43 \pm 1,93	41,00 \pm 1,72	41,43 \pm 1,66	41,29 \pm 1,95
Frequência de batimento cruzado (Hz)	18,51 \pm 0,71	18,67 \pm 0,69	18,60 \pm 0,37	18,66 \pm 0,56
Amplitude do movimento lateral da cabeça (μ m)	11,10 \pm 0,99	11,73 \pm 0,93	11,27 \pm 0,77	10,91 \pm 0,53
Velocidade média de percurso (μ m/s)	90,39 \pm 4,63	89,14 \pm 6,87	91,84 \pm 7,02	88,30 \pm 6,05
Velocidade curvilínea (μ m/s)	139,26 \pm 6,21	140,06 \pm 9,20	145,97 \pm 11,11	141,49 \pm 9,17
Velocidade retilínea (μ m/s)	57,59 \pm 4,41	53,13 \pm 4,15	54,21 \pm 3,80	52,30 \pm 4,05

Fonte: Frias (2022). Os resultados foram expressos em média \pm SEM (erro padrão da média).

Tabela 2 - Resultados das análises de cinética espermática de amostras seminais de carneiros (N=6) criopreservadas com diferentes concentrações de DNP suplementadas com 5mM de glicose (CG – Controle 0µM de DNP+5mM de glicose; GDNP2,5 – 2,5µm de DNP+5mM de glicose; GDNP5 - 5µM de DNP+5mM de glicose; GDNP10 - 10µm de DNP+5mM de glicose) pós-descongelamento, a 37°C.

Variável	CG	GDNP2,5	GDNP5	GDNP10
Motilidade (%)	43,14±8,40	32,00±8,26	46,00±7,22	42,71±7,67
Motilidade progressiva (%)	8,43±1,91	6,86±1,55	8,43±0,95	9,57±1,62
Velocidade rápida (%)	23,71±3,68	18,14±3,44	26,14±3,88	25,57±3,54
Velocidade média (%)	19,43±5	13,86±4,92	19,71±4,94	17,29±4,26
Velocidade lenta (%)	23,57±4,20	19,00±2,72	24,86±5,14	22,29±1,84
Estáticos (%)	33,29±10,51	49,00±9,88	29,14±8,04	35,00±7,91
Retilinearidade (%)	62,86±1,68	63,14±1,78	63,43±1,65	63,00±2,08
Linearidade (%)	42,86±1,39	43,57±1,57	43,29±1,95	43,00±1,62
Frequência de batimento cruzado (Hz)	18,31±0,49	18,21±0,36	18,46±0,44	18,86±0,64
Amplitude do movimento lateral da cabeça (µm)	11,59±0,56	11,23±0,58	11,29±0,62	11,54±0,64
Velocidade média de percurso (µm/s)	90,84±4,80	95,90±6,70	92,44±7,32	95,37±7,77
Velocidade curvilínea (µm/s)	143,84±6,61	149,76±9,81	146,03±10,92	149,16±11,65
Velocidade retilínea (µm/s)	55,86±2,61	58,76±2,72	57,54±3,37	58,36±3,27

Fonte: Frias (2022). Os resultados foram expressos em média ± SEM (erro padrão da média).

Igualmente, não foi observado diferença estatística nas características de membrana plasmática e acrossomal pela sonda FITC-PSA entre o controle e as diferentes doses do desacoplador na presença e ausência de glicose. Os valores obtidos estão retratados nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 – Resultados das análises de FITC-PSA em citometria de fluxo de amostras seminais de carneiros (N=6) criopreservadas com diferentes concentrações de DNP (C – Controle 0µM de DNP; DNP2,5 – 2,5µm de DNP; DNP5 - 5µM de DNP; DNP10 - 10µm de DNP) sem a suplementação de glicose pós-descongelamento, após lavagem com Percoll® 30%, a 37°C.

Variável	C	DNP2,5	DNP5	DNP10
Acrossoma lesado e membrana plasmática lesada (%)	31,29±4,35	30,11±3,79	31,63±4,58	29,01±4,40
Acrossoma lesado e membrana plasmática íntegra (%)	1,60±0,31	2,28±0,75	1,88±0,23	8,64±4,43
Acrossoma íntegro e membrana plasmática lesada (%)	57,83±3,56	57,30±4,00	55,51±3,61	43,66±7,05
Acrossoma íntegro e membrana plasmática íntegra (%)	9,26±1,09	10,32±1,48	10,96±2,14	18,60±5,93

Fonte: Frias (2022). Os resultados foram expressos em média ± SEM (erro padrão da média).

Tabela 4 – Resultados das análises de FITC-PSA em citometria de fluxo de amostras seminais de carneiros (N=6) criopreservadas com diferentes concentrações de DNP suplementadas com 5mM de glicose (CG – Controle 0 μ M de DNP+5mM de glicose; GDNP2,5 – 2,5 μ M de DNP+5mM de glicose; GDNP5 - 5 μ M de DNP+5mM de glicose; GDNP10 - 10 μ M de DNP+5mM de glicose) após lavagem com Percoll® 30%, pós-descongelamento, a 37°C.

Variável	CG	GDNP2,5	GDNP5	GDNP10
Acrossoma lesado e membrana plasmática lesada (%)	32,70 \pm 4,43	31,86 \pm 3,59	35,53 \pm 3,94	37,31 \pm 5,29
Acrossoma lesado e membrana plasmática íntegra (%)	5,62 \pm 3,82	6,88 \pm 3,26	5,77 \pm 2,70	3,91 \pm 1,03
Acrossoma íntegro e membrana plasmática lesada (%)	50,50 \pm 7,54	46,67 \pm 6,70	46,61 \pm 5,84	43,84 \pm 3,48
Acrossoma íntegro e membrana plasmática íntegra (%)	11,20 \pm 4,87	14,58 \pm 5,10	12,06 \pm 3,59	14,91 \pm 5,49

Fonte: Frias (2022). Os resultados foram expressos em média \pm SEM (erro padrão da média).

Foi observada diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre as populações de células sem estresse oxidativo e com membrana íntegra em amostras com concentração de 2,5 μ M de DNP e 2,5 μ M de DNP associado com glicose, onde a associação resultou em menor % de células com membrana lesionada, demonstrada na Figura 2. Os demais grupos não diferiram entre si nessa análise. Os dados da avaliação das espécies reativas de oxigênio e integridade de membrana por citometria de fluxo estão expressos nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5 – Resultados da análise com a sonda CellRox Green associada ao iodeto de propídio (PI) de amostras seminais de carneiros (N=6) criopreservadas com diferentes concentrações de DNP (C – Controle 0 μ M de DNP; DNP2,5 – 2,5 μ M de DNP; DNP5 - 5 μ M de DNP; DNP10 - 10 μ M de DNP) sem a suplementação de glicose pós-descongelamento, após lavagem com Percoll® 30%, a 37°C.

Variável	C	DNP2,5	DNP5	DNP10
Membrana plasmática lesada com estresse oxidativo (%)	2,72 \pm 1,51	1,21 \pm 0,23	0,99 \pm 0,20	0,94 \pm 0,23
Membrana plasmática íntegra com estresse oxidativo (%)	1,51 \pm 0,42	1,63 \pm 0,39	1,28 \pm 0,35	1,04 \pm 0,36
Membrana plasmática lesada sem estresse oxidativo (%)	91,17 \pm 1,34	93,39 \pm 1,25	90,13 \pm 1,96	91,20 \pm 1,49
Membrana plasmática íntegra sem estresse oxidativo (%)	4,58 \pm 1,24	3,77 \pm 0,93	7,62 \pm 2,10	6,83 \pm 1,68

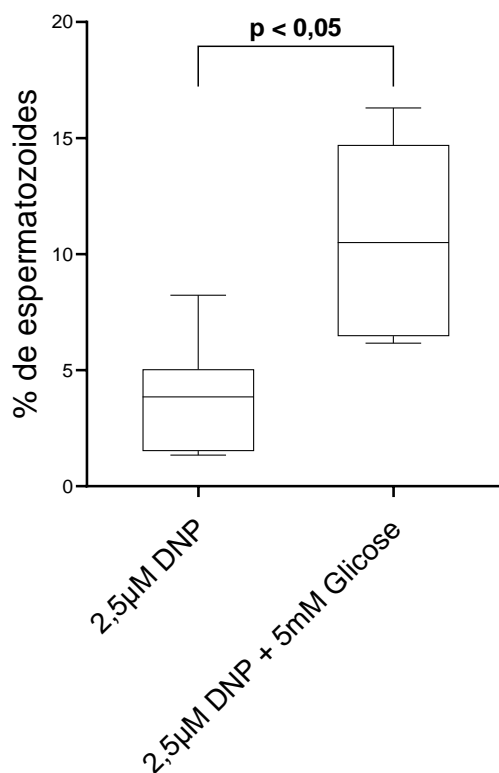
Fonte: Frias (2022). Os resultados foram expressos em média \pm SEM (erro padrão da média).

Tabela 6 - Resultados das análises da sonda CellRox Green associada ao iodeto de propídio (PI) de amostras seminais de carneiros (N=6) criopreservadas com diferentes concentrações de DNP suplementadas com 5mM de glicose (CG – Controle 0 μ M de DNP+5mM de glicose; GDNP2,5 – 2,5 μ m de DNP+5mM de glicose; GDNP5 - 5 μ M de DNP+5mM de glicose; GDNP10 - 10 μ m de DNP+5mM de glicose) após lavagem com Percoll® 30%, pós-descongelamento, a 37°C.

Variável	CG	GDNP2,5	GDNP5	GDNP10
Membrana plasmática lesada com estresse oxidativo (%)	1,04 \pm 0,27	0,830 \pm 0,21	0,85 \pm 0,20	0,76 \pm 0,21
Membrana plasmática íntegra com estresse oxidativo (%)	0,84 \pm 0,30	0,95 \pm 0,35	1,13 \pm 0,43	0,96 \pm 0,41
Membrana plasmática lesada sem estresse oxidativo (%)	91,67 \pm 1,71	87,51 \pm 1,38	86,96 \pm 2,46	86,26 \pm 3,24
Membrana plasmática íntegra sem estresse oxidativo (%)	6,45 \pm 1,92	10,71 \pm 1,52	11,05 \pm 2,72	11,99 \pm 3,42

Fonte: Frias (2022). Os resultados foram expressos em média \pm SEM (erro padrão da média).

Figura 2 – Gráfico da população de espermatozoides com membrana plasmática íntegra sem estresse oxidativo (%) na concentração de 2,5 μ M de DNP com e sem glicose



Fonte: Frias (2022). Resultados apresentados em boxplot com mediana, espaço interquartis e limites mínimo e máximo. Diferença entre os grupos estão definidas pela linha com o valor de p sobre as mesmas.

Não foram encontradas diferenças no PMM avaliado pela sonda JC1 entre os tratamentos com o desacoplador nem sua associação com a glicose. Os valores estão representados nas Tabelas 7 e 8.

Tabela 7 – Resultados das análises de potencial de membrana mitocondrial através da sonda JC1 de amostras seminais de carneiros (N=6) criopreservadas com diferentes concentrações de DNP (C – Controle 0 μ M de DNP; DNP2,5 – 2,5 μ m de DNP; DNP5 - 5 μ M de DNP; DNP10 - 10 μ m de DNP) sem a suplementação de glicose pós-descongelamento, após lavagem com Percoll® 30%, a 37°C.

Variável	C	DNP2,5	DNP5	DNP10
Potencial de membrana mitocondrial alto (%)	10,61 \pm 1,85	10,07 \pm 2,84	8,25 \pm 2,59	9,96 \pm 2,39
Potencial de membrana mitocondrial baixo (%)	60,36 \pm 6,97	51,20 \pm 10,61	66,23 \pm 7,24	53,19 \pm 5,54
Potencial de membrana mitocondrial intermediário (%)	29,01 \pm 8,52	38,73 \pm 12,38	25,53 \pm 5,34	36,84 \pm 6,39

Fonte: Frias (2022). Os resultados foram expressos em média \pm SEM (erro padrão da média).

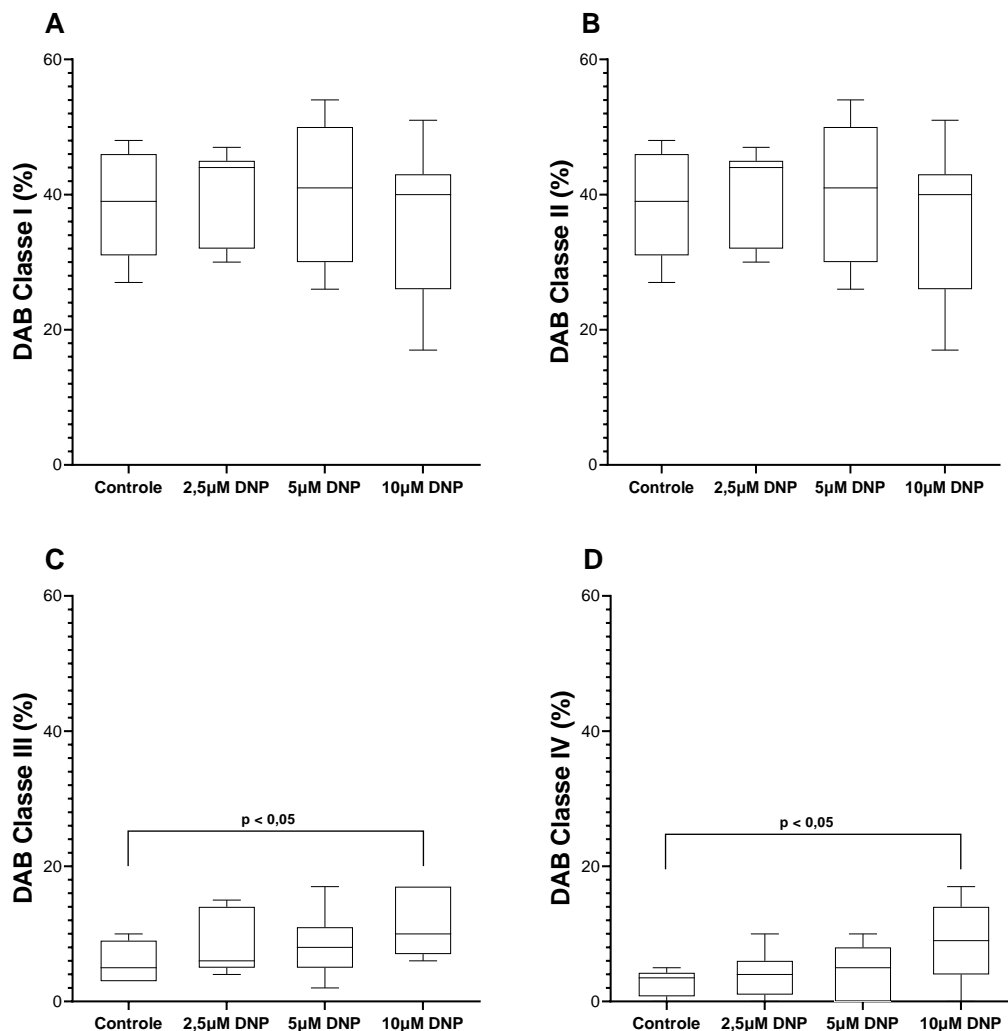
Tabela 8 – Resultados das análises de potencial de membrana mitocondrial através da sonda JC1 de amostras seminais de carneiros criopreservadas com diferentes concentrações de DNP suplementadas com 5mM de glicose (CG – Controle 0 μ M de DNP+5mM de glicose; GDNP2,5 – 2,5 μ m de DNP+5mM de glicose; GDNP5 - 5 μ M de DNP+5mM de glicose; GDNP10 - 10 μ m de DNP+5mM de glicose) pós-descongelamento, após lavagem com Percoll® 30%, a 37°C.

Variável	CG	GDNP2,5	GDNP5	GDNP10
Potencial de membrana mitocondrial alto (%)	14,50 \pm 4,70	9,41 \pm 2,78	11,44 \pm 2,03	10,92 \pm 3,72
Potencial de membrana mitocondrial baixo (%)	54,16 \pm 4,73	58,24 \pm 9,17	61,34 \pm 6,27	56,53 \pm 6,12
Potencial de membrana mitocondrial intermediário (%)	31,37 \pm 5,76	32,34 \pm 8,99	27,21 \pm 5,46	32,71 \pm 4,86

Fonte: Frias (2022). Os resultados foram expressos em média \pm SEM (erro padrão da média).

Foi observada diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em células com baixa (DAB III) e ausência de atividade mitocondrial (DAB IV) entre o grupo controle e o grupo de 10 μ M de DNP na ausência de glicose, representadas na Figura 2. Entre os grupos suplementados com glicose não foram observadas diferenças significativas, representados na Figura 3. Os dados da avaliação da atividade mitocondrial dos espermatozoides estão demonstrados nas Tabelas 9 e 10.

Figura 3 - Gráficos dos resultados da avaliação de atividade mitocondrial (DAB) de amostras tratadas com crescentes concentrações de DNP



Fonte: Frias (2022). Resultados apresentados em boxplot com mediana, espaço interquartis e limites mínimo e máximo. Diferença entre os grupos estão definidas pela linha com o valor de p sobre as mesmas. Os gráficos representam a atividade mitocondrial de espermatozoides tratados com diferentes concentrações de DNP na ausência de suplementação de glicose antes da criopreservação, em %. Em A: espermatozoides com alta atividade micotondrial (DAB Classe I); Em B: espermatozoides com média atividade micotondrial (DAB Classe II); Em C: espermatozoides com baixa atividade micotondrial (DAB Classe III); Em D: espermatozoides com ausência de atividade micotondrial (DAB Classe IV).

Tabela 9 – Resultados das análises dos índices de atividade mitocondrial pelo ensaio DAB de amostras seminais de carneiros (N=6) criopreservadas com diferentes concentrações de DNP (C – Controle 0 μ M de DNP; DNP2,5 – 2,5 μ M de DNP; DNP5 - 5 μ M de DNP; DNP10 - 10 μ M de DNP) sem a suplementação de glicose pós-descongelamento, a 37°C.

Variável	C	DNP2,5	DNP5	DNP10
DAB Classe I (%)	47,86 \pm 2,60	46,43 \pm 3,83	48,00 \pm 3,77	44,57 \pm 5,01
DAB Classe II (%)	38,71 \pm 2,88	41,00 \pm 2,62	39,43 \pm 3,87	35,14 \pm 4,39
DAB Classe III (%)	5,71 \pm 1,13	8,43 \pm 1,67	8,43 \pm 1,78	11,00 \pm 1,68
DAB Classe IV (%)	2,83 \pm 0,79	4,14 \pm 1,32	4,14 \pm 1,50	8,43 \pm 2,23

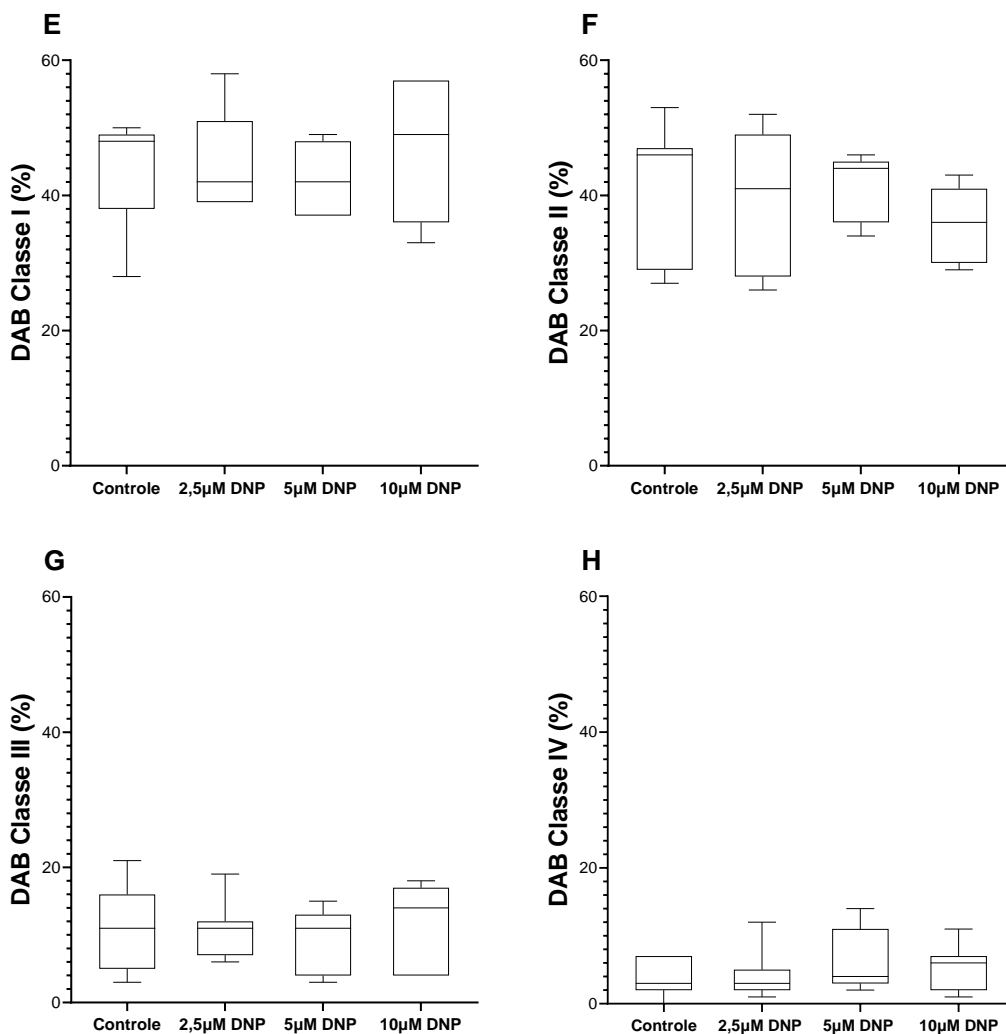
Fonte: Frias (2022). Os resultados foram expressos em média \pm SEM (erro padrão da média).

Tabela 10 – Resultados das análises dos índices de atividade mitocondrial pelo ensaio DAB de amostras seminais de carneiros (N=6) criopreservadas com diferentes concentrações de DNP suplementadas com 5mM de glicose (CG – Controle 0 μ M de DNP+5mM de glicose; GDNP2,5 – 2,5 μ M de DNP+5mM de glicose; GDNP5 - 5 μ M de DNP+5mM de glicose; GDNP10 - 10 μ M de DNP+5mM de glicose) pós-descongelamento, a 37°C.

Variável	CG	GDNP2,5	GDNP5	GDNP10
DAB Classe I (%)	44,00 \pm 3,08	45,43 \pm 2,66	42,71 \pm 1,98	47,43 \pm 3,64
DAB Classe II (%)	41,29 \pm 3,72	40,00 \pm 3,92	41,57 \pm 1,81	35,43 \pm 2,10
DAB Classe III (%)	11,00 \pm 2,34	10,57 \pm 1,65	9,57 \pm 1,69	11,86 \pm 2,25
DAB Classe IV (%)	3,71 \pm 0,97	4,14 \pm 1,39	6,14 \pm 1,74	5,29 \pm 1,32

Fonte: Frias (2022). Os resultados foram expressos em média \pm SEM (erro padrão da média).

Figura 4 - Gráficos dos resultados da avaliação de atividade mitocondrial (DAB) de amostras tratadas com crescentes concentrações de DNP suplementados com 5mM de Glicose



Fonte: Frias (2022). Resultados apresentados em boxplot com mediana, espaço interquartil e limites mínimo e máximo. Diferença entre os grupos estão definidas pela linha com o valor de p sobre as mesmas. Os gráficos representam a atividade mitocondrial de espermatozoides tratados com diferentes concentrações de DNP suplementados com 5mM de glicose antes da criopreservação, em %. Em E: espermatozoides com alta atividade micotondrial (DAB Classe I); Em F: espermatozoides com média atividade micotondrial (DAB Classe II); Em G: espermatozoides com baixa atividade micotondrial (DAB Classe III); Em H: espermatozoides com ausência de atividade micotondrial (DAB Classe IV).

Não foram observadas diferenças entre o controle e os tratamentos na integridade de membrana plasmática dos espermatozoides avaliada pela técnica de coloração Eosina/Nigrosina, nas concentrações de MDA na avaliação da suscetibilidade à peroxidação lipídica e na avaliação de suscetibilidade ao dano de

DNA (SCSA adaptado) entre as amostras, suplementadas ou não com glicose. Os resultados se encontram nas Tabela 11 e 12.

Tabela 11 - Resultados da análise de integridade de membrana plasmática pela técnica de coloração Eosina/nigrosina; suscetibilidade ao dano de DNA pela técnica SCSA adaptada; suscetibilidade a peroxidação lipídica (TBARS) de amostras seminais de carneiros (N=6) criopreservadas com diferentes concentrações de DNP (C – Controle 0 μ M de DNP; DNP2,5 – 2,5 μ M de DNP; DNP5 - 5 μ M de DNP; DNP10 - 10 μ M de DNP) sem a suplementação de glicose pós-descongelamento, após lavagem com Percoll® 30%, a 37°C.

Variável	C	DNP2,5	DNP5	DNP10
Membrana plasmática íntegra (%)	42,29 \pm 4,21	45,57 \pm 5,45	44,67 \pm 4,86	44,50 \pm 4,36
Suscetibilidade ao dano de DNA (%)	3,35 \pm 1,40	5,69 \pm 3,04	3,18 \pm 1,302	4,29 \pm 1,93
TBARS (ng de MDA/10 ⁶ espermatozoides)	25,07 \pm 7,59	24,41 \pm 6,97	27,83 \pm 11,53	33,41 \pm 16,91

Fonte: Frias (2022). Os resultados foram expressos em média \pm SEM (erro padrão da média).

Tabela 12 - Resultados da análise de integridade de membrana plasmática pela técnica de coloração Eosina/nigrosina; suscetibilidade ao dano de DNA pela técnica SCSA adaptada; suscetibilidade a peroxidação lipídica (TBARS) de amostras seminais de carneiros (N=6) criopreservadas com diferentes concentrações de DNP suplementadas com 5mM de glicose (CG – Controle 0 μ M de DNP+5mM de glicose; GDNP2,5 – 2,5 μ M de DNP+5mM de glicose; GDNP5 - 5 μ M de DNP+5mM de glicose; GDNP10 - 10 μ M de DNP+5mM de glicose) após lavagem com Percoll® 30%, pós-descongelamento, a 37°C.

Variável	CG	GDNP2,5	GDNP5	GDNP10
Membrana plasmática íntegra (%)	40,67 \pm 3,48	41,83 \pm	40 \pm 3,48	38,83 \pm 1,58
Suscetibilidade ao dano de DNA (%)	3,52 \pm 1,47	3,51 \pm 1,28	5,35 \pm 2,50	6,77 \pm 3,48
TBARS (ng de MDA/10 ⁶ espermatozoides)	22,01 \pm 9,81	30,11 \pm 11,75	34,03 \pm 16,30	18,83 \pm 6,50

Fonte: Frias (2022). Os resultados foram expressos em média \pm SEM (erro padrão da média).

7. DISCUSSÃO

Neste estudo, foram avaliados os efeitos de um desacoplamento mitocondrial moderado com a utilização do DNP em diferentes concentrações e o papel da glicólise na manutenção energética de espermatozoides de carneiro criopreservados. A via glicolítica é uma importante fonte de ATP para os espermatozoides de mamíferos em geral, energia fundamental para o cumprimento da função fecundante dessas células (STOREY, 2008). De fato, células espermáticas epididimárias de bovinos mantiveram seus padrões de motilidade na presença de um desacoplador mitocondrial quando suplementadas com glicose (LOSANO et. al, 2017). Nas concentrações de DNP utilizadas neste experimento (2,5, 5 e 10 μ M) não foram observadas diferenças entre os padrões de motilidade espermática analisadas pelo CASA na presença e ausência de 5mM de glicose, sendo que na comparação entre os controles sem DNP (0mM e 5mM de glicose) não atingiu significância estatística para maior motilidade progressiva nas amostras suplementadas ($p = 0,0995$). Em um estudo dos efeitos do desacoplamento e a função da glicólise em espermatozoides de carneiros, a utilização do desacoplador carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP) e de um inibidor da via glicolítica (DOG) resultou na alteração de parâmetros de motilidade (porém sem alteração significativa da motilidade total) e de atividade mitocondrial (LOSANO, 2017), demonstrando a importância de ambas as vias metabólicas no fornecimento de ATP para a célula. Aparentemente, o DNP nas concentrações utilizadas não foi capaz de interferir nos parâmetros de motilidade, possivelmente por conta de sua ação mais moderada e passível de ser revertida em comparação ao CCCP (SKULACHEV, 1998).

No teste de integridade de membrana plasmática e presença de estresse oxidativo, foi observada diferença na porcentagem de espermatozoides sem estresse oxidativo com a membrana íntegra apenas entre amostras tratadas com 2,5 μ M de DNP e 2,5 μ M de DNP suplementadas com 5mM de glicose, onde a associação apresentou maior porção de células com membrana íntegra na ausência de estresse oxidativo. EROs são grandes causadoras de disrupções de membrana plasmática em espermatozoides (SANOCKA, 2004) e também atuam como inibidoras da glicólise através da desativação das enzimas glicolíticas gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e piruvato quinase M2 (PKM2) ao atacarem diretamente resíduos de cisteína presentes em sua estrutura. De outra maneira, em resposta às EROs, a

proteína p53 causa a ativação de reguladores de glicólise e apoptose (TIGAR), que inibe a enzima fosfofrutoquinase-1 (revisado por MULLARKY, 2015). Além disso, a produção de ATP mitocondrial igualmente parece ser essencial para a manutenção da integridade dessas membranas, onde a inibição do complexo I em espermatozoides de garanhões foi deletéria para as membranas dessas células (DAVILA, 2016). É possível que o fornecimento de substratos pela glicólise para a ação dos complexos na cadeia transportadora de elétrons tenha auxiliado a produção de ATP, o que poderia explicar a menor quantidade de espermatozoides com membrana lesionada quando na presença de glicose e sem estresse oxidativo. Porém, não foram obtidos resultados significativos entre os demais grupos, o que pode indicar que a diferença encontrada nesse grupo não seja biologicamente relevante.

A queda no potencial de membrana mitocondrial na presença de desacopladores mitocondriais é um evento esperado pois ele promove a entrada de prótons do espaço intermembranas para a matriz mitocondrial, mudando o gradiente eletrolítico da organela (ANDREYEV, 1989). Esse efeito foi observado em espermatozoides peixes na concentração de 10 μ M de DNP (FANG, 2014) e de carneiros, com o uso do FCCP (LOSANO, 2017). Todavia, não observou-se diferença no potencial de membrana mitocondrial entre os tratamentos (Tabelas 7 e 8). É possível que as concentrações utilizadas nas amostras que receberam o DNP, que é um desacoplador mais moderado, foram insuficientes para causar uma alteração significativa no potencial de membrana mitocondrial de espermatozoides ovinos. A glicose poderia influenciar no PMM ao fornecer substratos para o ciclo do ácido cítrico, o qual gera os subprodutos NADH₂ e FADH₂ para consumo na cadeia transportadora de elétrons. Estes são utilizados pelos complexos I e II, onde o primeiro tem papel regulador do PMM (SHARMA, 2009). Porém, não foi observada diferença significativa da ação da glicose no PMM das amostras analisadas no presente estudo.

Em relação à atividade mitocondrial, a quantidade de células espermáticas com baixa atividade mitocondrial e ausência de atividade (DAB Classe III e IV, respectivamente) tratadas com 10 μ M de DNP foram maiores em relação ao controle na ausência de glicose (Figura 3). É possível que na maior concentração do desacoplador tenha ocorrido a diminuição da atividade mitocondrial de espermatozoides que estavam com a mesma comprometida, o que concordaria com a teoria proposta por Pallanck onde organelas disfuncionais (com baixa produção de

ATP e alta formação de EROs) são eliminadas através de ativação de cascatas de sinalização de apoptose e morte celular, funcionando como mecanismo de proteção às organelas ao seu redor, selecionando as melhores populações mitocondriais (PALLANCK, 2011; JEŽEK, 2018). Nas amostras suplementadas com glicose não foram observadas diferenças na atividade mitocondrial entre os tratamentos (Figura 4), o que poderia indicar uma influência da glicose na manutenção dessa atividade, porém não houve diferença entre essa associação e o DNP sozinho (Tabelas 9 e 10).

Os demais resultados obtidos neste estudo indicam que não houve influência significativa do DNP quando utilizado nas concentrações de 2,5, 5 e 10 μ M associado ou não com glicose no processo de criopreservação nos parâmetros de motilidade, suscetibilidade ao estresse oxidativo e a danos de DNA e nos níveis de potencial de membrana mitocondrial. Porém, foi observado uma possível ação do DNP na seleção de mitocôndrias mais funcionais, que conseguem manter sua atividade mitocondrial alta e produzir menos EROs (JEŽEK, 2018). Essa seleção parece ocorrer através da PINK1, que é uma serina/treonina kinase que se acumula seletivamente em mitocôndrias despolarizadas, recrutando enzimas que levam à destruição mitocondrial por autofagia, sistema demonstrado em modelos de doença de Parkinson (NARENDRA, 2010). Em estudos de espermatozoides humanos, foi confirmada a presença de mecanismos de autofagia, o que pode indicar que este é um processo ativo entre essas células (APARICIO, 2016), que também parecem ser ativados na presença de estresse oxidativo (URIBE, 2022).

É possível que as concentrações de DNP utilizadas foram insuficientes para causar mudanças dos atributos espermáticos passíveis de serem observadas através das técnicas de avaliação utilizadas, já que outros estudos demonstraram o efeito de outras moléculas desacopladoras nas características de funcionalidade espermáticas. Além disso, é possível que na composição do diluidor de sêmen para criopreservação utilizado tenha substratos nutricionais que participam da glicólise, o que explicaria a carência de resultados nos grupos onde não houve o incremento de glicose. Trabalhos futuros neste âmbito devem procurar utilizar meios sem esses substratos ou mensurar o seu consumo pelas células, uma vez que a produção de energia e o recrutamento da via glicolítica parece acontecer sob demanda de ATP (HALEY, 2021) e possivelmente concentrações mais altas do desacoplador para talvez ser possível verificar seus efeitos. Finalmente, mais estudos são necessários para o entendimento da ação dos desacopladores mitocondriais na bioenergética,

funcionalidade e homeostase oxidativa no protocolo de congelamento dos gametas masculinos de ovinos.

8. CONCLUSÃO

-Foi observada maior porcentagem de espermatozoides DAB Classe III e IV em amostras tratadas com 10 μ M de DNP em relação ao controle (0 μ M DNP) na ausência da glicose, o que poderia indicar uma seleção de melhores populações mitocondriais. Porém, não houveram diferenças significativas nos demais atributos espermáticos entre os grupos, sendo possível que não tenham sido alcançadas as concentrações terapêuticas de DNP para espermatozoides de carneiros.

9. REFERÊNCIAS

AGARWAL A, AITKEN RJ, ALVAREZ JG. Studies on men's health and fertility. Em: Oxidative stress in applied basic research and clinical practice: New York, Dordrecht, Heidelberg, London. **Springer Science and Business Media**, LLC, 2012.

AGARWAL A, VIRK G, ONG C, DU PLESSIS SS. Effect of oxidative stress on male reproduction. **World J Mens Health**, v. 32, n. 1, p.1-17, 2014.

AHMAD M, WOLBERG A, KAHWAJI CI. BIOCHEMISTRY, ELECTRON TRANSPORT CHAIN. **StatPearls Publishing**, Treasure Island (Flórida), janeiro de 2022. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526105/>>. Acesso em 20-08-2022.

AITKEN RJ, CLARKSON JS, FISHEL S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. **Biol Reprod**, v. 41, n. 1, p. 183-97, 1989.

AITKEN RJ, BAKER HW. Seminal leukocytes: passengers, terrorists or good samaritans? *Hum Reprod*, v. 10, n. 7, p. 1736-9, 1995.

AKRAM M. Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism. **Cell Biochem Biophys**, v. 68, n. 3, p. 475-8, 2014.

ALI J, ALHARBI NH, ALI N. Historical Background on Gamete and Embryo Cryopreservation. *Methods Mol Biol*, n. 1568, p. 3-20, 2017.

Andrade JS, Moreira EM, Silva GM, Souza VL, Nunes VRR, Júnior JSO et al. Aspectos uterinos, foliculares e seminiais que afetam a IATF em vacas de corte no período pós-parto. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte.; v. 42. n. 3-4, p. 77-89, 2018.

AON M.A., CORTASSA S., O'ROURKE B., 2nd Percolation and criticality in a mitochondrial network. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v. 101, p. 4447–4452, 2004.

APARICIO IM, ESPINO J, BEJARANO I, GALLARDO-SOLER A, CAMPO ML, SALIDO GM, PARIENTE JA, PEÑA FJ, TAPIA JA. Autophagy-related proteins are

functionally active in human spermatozoa and may be involved in the regulation of cell survival and motility. **Sci Rep**, v. 16, n. 6, p. 336-47, 2016.

ASBIA, 2021. Index ASBIA 2021. **Associação Brasileira de Inseminação Artificial**. <<http://www.asbia.org.br/wp-content/uploads/2022/02/Index-Asbia-2021-M%C3%ADdia-3.pdf>>. Acesso em: 03 ago. 2022.

AMIDI F, PAZHOHAN A, SHABANI NASHTAEI M, KHODARAHMIAN M, NEKOONAM S. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. **Cell Tissue Bank**, v. 17, n. 4, p. 745-756, 2016.

CHAVARRÍA, M. E., REYES, A., & ROSADO, A. El factor masculino. II. El espermatozoide. Estructura y funcionamiento: The male factor. II. Spermatozoa. Structure and function. **Ginecología y obstetricia de Mexico**, v. 65, p. 413–421, 1997.

BARTH, A. D., OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames: University Press, p. 285, 1989.

BARUSELLI, Pietro Sampaio et al. Evolução e perspectivas da inseminação artificial em bovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 43, n. 2, p. 308-314, 2019.

BARUSELLI, P.S. IATF bate mais um recorde e supera 26 milhões de procedimentos em 2021. **Boletim Eletrônico do Departamento de Reprodução Animal/FMVZ/USP**, 6a ed., 2022. <<http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico-vra/>>. Acesso em 06/08/2022

BARTHELEMY, C., ROYERE, D., HAMMAHAH, S., LEBOS, C., THARANNE, M.-J., AND LANSAC, J. Ultrastructural changes in membranes and acrosome of human sperm during cryopreservation. **Syst. Biol. Reprod. Med**, v. 25, p. 29–40, 1990.

BATISSACO, Leonardo. **Criopreservação do sêmen ovino com incorporação de colesterol por ciclodextrina**. 2014. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal)

- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2014.

BERRY BJ, TREWIN AJ, AMITRANO AM, KIM M, WOJTOVICH AP. Use the Protonmotive Force: Mitochondrial Uncoupling and Reactive Oxygen Species. **J Mol Biol**, v. 430, n. 21, p. 3873-3891, 2018.

BILODEAU, J.-F., CHATTERJEE, S., SIRARD, M.-A. e GANGNON, C. Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Mol. Reprod. Dev**, v. 55, p. 282-288, 2000.

BROMFIELD JJ. Seminal fluid and reproduction: much more than previously thought. **J Assist Reprod Genet**, v. 31, n. 6, p. 627-636, 2014.

CADENAS S. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. **Biochim Biophys Acta Bioenerg**, v. 1859, n. 9, p. 940-950, 2018

CALDEIRA DA SILVA CC, CERQUEIRA FM, BARBOSA LF, MEDEIROS MH, KOWALTOWSKI AJ. Mild mitochondrial uncoupling in mice affects energy metabolism, redox balance and longevity. **Aging Cell**, v. 7, n. 4, p. 552-60, 2008.

CELEGHINI, E., DE ARRUDA, R., DE ANDRADE, A., NASCIMENTO, J. AND RAPHAEL, C. Practical Techniques for Bovine Sperm Simultaneous Fluorimetric Assessment of Plasma, Acrosomal and Mitochondrial Membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42 p. 479-488, 2007.

CHATTERJEE S, DE LAMIRANDE E, GAGNON C. Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. **Mol Reprod Dev**, v. 60, n. 4, p. 498-506, 2001.

H.J. CHI, J.H. KIM, C.S. RYU, J.Y. LEE, J.S. PARK, D.Y. CHUNG, S.Y. CHOI, M.H. KIM, E.K. CHUN, S.I. ROH. Protective effect of antioxidant supplementation in sperm-preparation medium against oxidative stress in human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 23, n. 5, p. 1023-1028, 2008.

CHALMERS S., NICHOLLS D.G. The relationship between free and total calcium concentrations in the matrix of liver and brain mitochondria. **J. Biol. Chem**, v. 278, p. 19062–19070, 2003.

CLARKE GN. A.R.T. and history, 1678-1978. **Hum Reprod**, v. 21, n.7, p. 1645-50. 2006.

CUNHA FM, CALDEIRA DA SILVA CC, CERQUEIRA FM, KOWALTOWSKI AJ. Mild mitochondrial uncoupling as a therapeutic strategy. **Curr Drug Targets**, v. 12, n. 6, p. 783-9, 2011.

DAVILA MP, MUÑOZ PM, BOLAÑOS JM, STOUT TA, GADELLA BM, TAPIA JA, DA SILVA CB, FERRUSOLA CO, PEÑA FJ. Mitochondrial ATP is required for the maintenance of membrane integrity in stallion spermatozoa, whereas motility requires both glycolysis and oxidative phosphorylation. **Reproduction**, v. 152, n. 6, p. 683-694, 2016.

DE LAMIRANDE E, JIANG H, ZINI A, KODAMA H, GAGNON C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Rev Reprod**, v. 2, n. 1, p. 48-54. 1997.

DEMINE S, RENARD P, ARNOULD T. Mitochondrial Uncoupling: A Key Controller of Biological Processes in Physiology and Diseases. **Cells**, v. 8, n. 8, p. 795, 2019.

DOMENICO, QUÊTI & SOARES, MARCIO & GAYA, LEILA & LORENTZ, LEANDRO & ROVADOSCKI, GREGORI. (2009). Distribuição de características de manejo dos touros leiteiros testados das raças holandês e jersey disponibilizados no Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 1, 2009.

DONG Q, TOLLNER TL, RODENBURG SE, HILL DL, VANDEVOORT CA. Antioxidants, Oxyrase, and mitochondrial uncoupler 2,4-dinitrophenol improved post-thaw survival of rhesus monkey sperm from ejaculates with low cryosurvival. **Fertility and Sterility**, v. 94, p. 2359-61, 2010.

DONNELLY ET, MCCLURE N, LEWIS SE. Antioxidant supplementation in vitro does not improve human sperm motility. **Fertil Steril**, v. 72, n. 3, p. 484-95,1999.

DU PLESSIS SS, AGARWAL A, HALABI J, TVRDA E. Contemporary evidence on the physiological role of reactive oxygen species in human sperm function. **J Assist Reprod Genet**, v. 32, n. 4, p. 509-20, 2015

DUANE L. GARNER, CHERYL A. THOMAS, HANNES W. JOERG, J. MEL DEJARNETTE, CLIFTON E. MARSHALL. Fluorometric Assessments of Mitochondrial Function and Viability in Cryopreserved Bovine Spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 57, n. 6, p. 1401–1406, 1997.

DURU NK, MORSHEDI M AND OEHNINGER S. Effects of hydrogen peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. **Fertil Steril**, v. 74, p. 1200–1207, 2000.

DUTTA S, MAJZOUB A, AGARWAL A. Oxidative stress and sperm function: A systematic review on evaluation and management. **Arab J Urol**, v. 17, n. 2, p. 87-97, 2019.

EVANS, GARETH, AND WM CHISHOLM MAXWELL. Salamons' artificial insemination of sheep and goats. *Trop Anim Health Prod*. v. 23, n. 114, 1991.

EVANS, H.C., DINH, T.T.N., UGUR, M.R. *et al*. Lipidomic markers of sperm cryotolerance in cattle. **Scientific Repports**, v. 10, 2020.

EVANS HC, DINH TTN, HARDCASTLE ML, GILMORE AA, UGUR MR, HITIT M, JOUSAN FD, NICODEMUS MC, MEMILI E. Advancing Semen Evaluation Using Lipidomics. **Front Vet Sci**, 2021 v. 8, 2021.

FADDY MJ, GOSDEN MD, GOSDEN RG. A demographic projection of the contribution of assisted reproductive technologies to world population growth. **Reprod Biomed Online**, v. 36, n. 4, p. 455-458, 2018.

FANG L, BAI C, CHEN Y, DAI J, XIANG Y, JI X, *et al.* Inhibition of ROS production through mitochondria- targeted antioxidant and mitochondrial uncoupling increases post-thaw sperm viability in yellow catfish. **Cryobiology**, v. 69, p. 386-93, 2014.

FEDERICO A, CARDAIOLI E, DA POZZO P, FORMICHI P, GALLUS GN, RADI E. Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. **J Neurol Sci**, v. 32, n. 1-2, p. 254-62, 2012.

FERRAMOSCA A, ZARA V. Bioenergetics of mammalian sperm capacitation. **Biomed Res Int**, 2014.

FIGUEROA E., VALDEBENITO I., ZEPEDA A.B., FIGUEROA C.A., DUMORNE´ K., CASTILLO R.L., FARIAS J.G. Effects of cryopreservation on mitochondria of fish spermatozoa. **Rev. Aquacult**, v. 9, p. 76–87, 2017.

FLEMING, A.D. AND YANAGIMACHI, R. Effects of various lipids on the acrosome reaction and fertilizing capacity of guinea pig spermatozoa with special reference to the possible involvement of lysophospholipid in the acrosome reaction. **Gamete Res.**,v. 4, p. 253–273, 1981.

F.J. PEÑA, A. JOHANNISSON, M. WALLGREN, H. RODRIGUEZ MARTINEZ. Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 1–2, p. 85-98, 2003.

GEISLER, J.G. Targeting energy expenditure via fuel switching and beyond. **Diabetologia**, v. 54, p. 237–244, 2011.

GEISLER JG. 2,4 Dinitrophenol as medicine. **Cells**, v. 8, n. 3, p. 280, 2019.

GOMES, Larissa Linhares. **ESTRATÉGIAS DE MELHORAMENTO GENÉTICO EM GADO DE CORTE UTILIZANDO PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES.** 2021.

Zootecnia. Escola de Ciências Agrárias e Biológicas, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia – GO, 2021.

GONÇALVES, Rômany Louise Ribeiro, VIANA, João Henrique Moreira. **Situação atual da produção de embriões bovinos no Brasil e no mundo.** In: **Anais do XXIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA-2019)**; Gramado, RS, 15 a 17 de maio de 2019.

GONZALES, HUGO & SCOTTO, C & DAVALOS, R & GONZALES, HJGO & SCOTTO, CARLOS. Biotecnología reproductiva en animales silvestres. **Reproductive Biotechnology in Wild Animals**, v. 9, p. 69-82, 2019.

GOOVAERTS, I. G. F.; HOFACK, G. G.; VAN SOOM, A.; DEWULF, J.; NICHI, M.; DE KRUIF, A.; BOLS, P. E. J. Evaluation of epididymal semen quality using the Hamilton–Thorne analyser indicates variation between the two caudae epididymides of the same bull. **Theriogenology**, v. 66, n. 2, p. 323-330, 2006.

GURTOVENKO AA, ANWAR J. Modulating the structure and properties of cell membranes: the molecular mechanism of action of dimethyl sulfoxide. **J Phys Chem**, v. 111, n. 35, p. 10453-60, 2007.

HALEY YOST, MERANDA QUIJAS, HAYLEY SMITH, TANEA REED. Chapter 7 - Decreased bioenergetics in traumatic brain injury. **Clinical Bioenergetics**, p. 169-194, 2021.

HAMMERSTEDT RH, GRAHAM JK, NOLAN JP. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **J Androl**, v. 11, n. 1, p. 73-88, 1990.

HENKEL RR. Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. **Asian J Androl**, v. 13, p. 43-52, 2011.

HEZAVEHEI, M., SHARAFI, M., KOUCHESFAHANI, H. M., HENKEL, R., AGARWAL, A., ESMAEILI, V., & SHAHVERDI, A. Sperm cryopreservation: A review on current

molecular cryobiology and advanced approaches. **Reproductive biomedicine online**, v. 37, n. 3, p. 327–339, 2018.

HINKOVSKA-GALCHEVA, V., PETKOVA, D., & KOUMANOV, K. Changes in the phospholipid composition and phospholipid asymmetry of ram sperm plasma membranes after cryopreservation. **Cryobiology**, v. 26, n. 1, p. 70–75, 1989.

HROUDOVÁ J, FIŠAR Z. Control mechanisms in mitochondrial oxidative phosphorylation. **Neural Regen Res**, v. 8, n. 4, p. 363-75, 2013.

HRUDKA F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. **International Journal of Andrology**, v. 10, p. 809-28, 1987.

IPAM. **AMAZÔNIA EM CHAMAS: DESMATAMENTO, FOGO E PECUÁRIA EM TERRAS PÚBLICAS**. Instituto de Pesquisa Ambiental da Amazônia. 2021. Disponível em: <<https://ipam.org.br/wp-content/uploads/2022/05/Amazo%CC%82nia-em-Chamas-8-pecua%CC%81ria-pt.pdf>>. Acesso em: 21/09/2022.

JEŽEK J, COOPER KF, STRICH R. Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Dynamics: The Yin and Yang of Mitochondrial Dysfunction and Cancer Progression. **Antioxidants (Basel)**, v. 7, n. 1, p. 13, 2018.

J.M. SZTEIN, T. TAKEO, N. NAKAGATA. History of cryobiology, with special emphasis in evolution of mouse sperm cryopreservation. **Cryobiology**, v. 82, p. 57-63, 2018.

J.P. BRENNAN, R.G. BERRY, M. BAGHAI, M.R. DUCHEN, M.J. Shattock FCCP is cardioprotective at concentrations that cause mitochondrial oxidation without detectable depolarisation. **Cardiovasc. Res.**, v. 72, p. 322-330, 2006.

KELSO, K. A., A. REDPATH, R. C. NOBLE, AND B. K. SPEAKE. Lipid and antioxidant changes in spermatozoa and seminal plasma throughout the reproductive period of bulls. **Reproduction**, v. 109, no. n. 1, p. 1-6, 1997.

KIM, S., LEE, Y. J., & KIM, Y. J. Changes in sperm membrane and ROS following cryopreservation of liquid boar semen stored at 15 °C. **Animal reproduction science**, v. 124, n. 1-2, p. 118–124, 2011.

KOPPERS AJ, DE IULIIS GN, FINNIE JM, MCLAUGHLIN EA, AITKEN RJ. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 93, n. 8, p. 3199-207, 2008.

KOWALCZYK A. The Role of the Natural Antioxidant Mechanism in Sperm Cells. **Reprod Sci**, v. 29, n. 5, p. 1387-1394, 2022

LAMBERT AJ, BRAND MD. Reactive oxygen species production by mitochondria. **Methods Mol Biol**. v. 554, p.165-81, 2009.

LEDESMA, A., DE LACOBIA, M.G. & RIAL, E. The mitochondrial uncoupling proteins. **Genome Biol** 3, 2002.

LIU D., ZHANG Y., GHARAVI R., PARK H.R., LEE J., SIDDIQUI S., TELLJOHANN R., NASSAR M.R., CUTLER R.G., BECKER K.G. The mitochondrial uncoupler DNP triggers brain cell mTOR signaling network reprogramming and CREB pathway up-regulation. **J. Neurochem**, v. 134, p. 677–692, 2015.

LOSANO, João Diego De Agostini. **Papel da mitocôndria na homeostase oxidativa e na funcionalidade de espermatozoides ovinos submetidos à criopreservação**. 2016. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

LOSANO J, ANGRIMANI D, DALMAZZO A, RUI BR, BRITO MM, MENDES CM, KAWAI G, VANNUCCHI CI, ASSUMPÇÃO M, BARNABE VH, NICHI M. Effect of

mitochondrial uncoupling and glycolysis inhibition on ram sperm functionality. **Reprod Domest Anim**, v. 52, n. 2, p. 289-297, 2017.

LUCIO CF, SILVA LC, REGAZZI FM, ANGRIMANI DS, NICHI M, ASSUMPÇÃO ME, VANNUCCHI CI. Effect of reduced glutathione (GSH) in canine sperm cryopreservation: In vitro and in vivo evaluation. **Cryobiology**, v. 72, n. 2, p. 135-40, 2016.

ŁUCZAJ W., GȨGOTEK A., SKRZYDLEWSKA E. Antioxidants and HNE in redox homeostasis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 111, p. 87–101, 2017.

LÜ JM, LIN PH, YAO Q, CHEN C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **J Cell Mol Med**, v. 14, n. 4, p. 840-860, 2010.

MANDUMPAL JB, KRECK CA, MANCERA RL. A molecular mechanism of solvent cryoprotection in aqueous DMSO solutions. **Phys Chem Chem Phy.**, v. 13, n. 9, p. 3839–3842, 2010.

MARTÍNEZ-REYES, I., CHANDEL, N.S. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. **Nat Commun**, v. 11, p. 102, 2020.

MAZUR P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **Am J Physiol**, v. 247, n. 3-1, p. 125-42, 1984.

MEDRANO, ALFREDO. AND CONTRERAS, CARLOS. AND HERRERA, FERNANDO. AND ALCANTAR-RODRIGUEZ, ALICIA. Melatonin as an antioxidant preserving sperm from domestic animals. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 6, n. 6, p. 241-246, 2017.

MENNELLA MR, JONES R. Properties of spermatozoal superoxide dismutase and lack of involvement of superoxides in metal-ion-catalysed lipid-peroxidation and reactions in semen. **Biochem J**, v. 191, n. 2, p. 289-97, 1980.

MICHAEL A, ALEXOPOULOS C, PONTIKI E, HADJIPAVLOU-LITINA D, SARATSIS P, BOSCOS C. Effect of antioxidant supplementation on semen quality and reactive oxygen species of frozen-thawed canine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 68, n. 2, p. 204-12, 2007.

MINNERS J, VAN DEN BOS EJ, YELLON DM, SCHWALB H, OPIE LH, SACK MN. Dinitrophenol, cyclosporin A, and trimetazidine modulate preconditioning in the isolated rat heart: support for a mitochondrial role in cardioprotection. **Cardiovasc Res**, v. 47, n. 1, p. 68-73, 2000.

MUKAI C, OKUNO M. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 540-7, 2004.

MOHAMED H. MOUSTAFA, RAKESH K. SHARMA, JULIE THORNTON, EDWARD MASCHA, MOHAMMED A. ABDEL-HAFEZ, ANTHONY J. THOMAS, ASHOK AGARWAL. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. **Human Reproduction**, v. 19, n. 1, p. 129–138, 2004.

MULLARKY E, CANTLEY LC. DIVERTING GLYCOLYSIS TO COMBAT OXIDATIVE STRESS. IN: NAKAO K, MINATO N, UEMOTO S. Innovative Medicine: **Basic Research and Development**, Springer, 2015.

NARENDRA DP, JIN SM, TANAKA A, SUEN DF, GAUTIER CA, SHEN J, COOKSON MR, YOULE RJ. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. **PLoS Biol**, v. 26, n. 8, 2010.

NICHI, Marcilio. **Efeito do tratamento com antioxidantes e ácidos graxos poli-insaturados em amostras espermáticas epididimárias de touros**. 2009. Tese

(Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

O'CONNELL M., MCCLURE N., LEWIS S.E.M. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. **Hum. Reprod**, v. 17, p. 704–709, 2002.

OEHNINGER S, BLACKMORE P, MAHONY M, HODGEN G. Effects of hydrogen peroxide on human spermatozoa. *J Assist Reprod Genet.* v. 12, n. 1, p. 41-7, 1995.

OHKAWA H, OHISHI N, YAGI K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-8, 1979.

PANDYA J.D., PAULY J.R., NUKALA V.N., SEBASTIAN A.H., DAY K.M., KORDE A.S., MARAGOS W.F., HALL E.D., SULLIVAN P.G. Post-Injury Administration of Mitochondrial Uncouplers Increases Tissue Sparing and Improves Behavioral Outcome following Traumatic Brain Injury in Rodents. **J. Neurotrauma**. v. 24, p. 798–811, 2007.

PEDROSA AC, ANDRADE TORRES M, VILELA ALKMIN D, PINZON JEP, KITAMURA MARTINS SMM, COELHO DA SILVEIRA J, FURUGEN CESAR DE ANDRADE A. Spermatozoa and seminal plasma small extracellular vesicles miRNAs as biomarkers of boar semen cryotolerance. **Theriogenology**, v. 174, p. 60-72, 2021

PEGG DE. PRINCIPLES OF CRYOPRESERVATION. IN: DAY JG, STACEY GN, eds. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. **Methods in Molecular Biology**, v. Humana Press, p. 39–75, 2007.

PERIS-FRAU P, SOLER AJ, INIESTA-CUERDA M, MARTÍN-MAESTRO A, SÁNCHEZ-AJOFRÍN I, MEDINA-CHÁVEZ DA, FERNÁNDEZ-SANTOS MR, GARCÍA-ÁLVAREZ O, MAROTO-MORALES A, MONTORO V, GARDE JJ. Sperm Cryodamage in Ruminants: Understanding the Molecular Changes Induced by the

Cryopreservation Process to Optimize Sperm Quality. **Int J Mol Sci.**, v. 21, n. 8, p. 2781, 2020.

PETRENKO AY, CHERKASHINA DV, SOMOV AY, TKACHEVA EN, SEMENCHENKO OA, LEBEDINSKY AS, FULLER BJ. Reversible mitochondrial uncoupling in the cold phase during liver preservation/reperfusion reduces oxidative injury in the rat model. **Cryobiology**, v. 60, n. 3, p. 293-300, 2010.

POLGE, C., SMITH, A. & PARKES, A. Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures. **Nature**, v. 164, p. 666, 1949.

POLGE C. Sir Alan Sterling Parkes: 10 September 1900 - 17 July 1990. **Biogr Mem Fellows R Soc**, v. 52, p. 263-83, 2006.

PONGLOWHAPAN S, ESSÉN-GUSTAVSSON B, LINDE FORSBERG C. Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. **Theriogenology**, v. 62, n. 8, p. 1498-517, 2004.

RIESCO MF, ALVAREZ M, ANEL-LOPEZ L, NEILA-MONTERO M, PALACIN-MARTINEZ C, MONTES-GARRIDO R, BOIXO JC, DE PAZ P, ANEL L. Multiparametric Study of Antioxidant Effect on Ram Sperm Cryopreservation—From Field Trials to Research Bench. **Animals**, v. 11, n. 2, p. 283, 2021.

SABETI P, POURMASUMI S, RAHIMINIA T, AKYASH F, TALEBI AR. Etiologies of sperm oxidative stress. **Int J Reprod Biomed**, v. 14, n. 4, p. 231-240, 2016.

SALVADOR, DANIEL FÁBIO. Quatro gerações de biotecnologias em reprodução animal. **Revista Educação Pública**, v. 19, n. 31, 2019.

SANOCKA D, KURPISZ M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 2, n. 12, 2004.

SATTAR A., M. FAROOQ, M. KHAN, A. REHMAN, K. JAVED. Effect of addition of sodium pyruvate in extender on post-thaw quality of Beetal buck semen. **Journal of Animal Science**, v. 96, n. 3, p. 456, 2018.

SHARMA LK, LU J, BAI Y. Mitochondrial respiratory complex I: structure, function and implication in human diseases. **Curr Med Chem**, v. 16, n. 10, p. 1266-1277, 2009

SILVA, KAREN & GAMBOA, SANDRA & RODRIGUES, ANA SOFIA & RAMALHO-SANTOS, JOÃO & GUERRA, MARIA.. Effect of pyruvate and trolox added to the extender used for freezing fertile and subfertile stallion semen. **Ciência Rural**, v. 38, p. 2271-2277, 2008.

SKAKKEBÆK NE, LINDAHL-JACOBSEN R, LEVINE H, ANDERSSON AM, JØRGENSEN N, MAIN KM, LIDEGAARD Ø, PRISKORN L, HOLMBOE SA, BRÄUNER EV, ALMSTRUP K, FRANCA LR, ZNAOR A, KORTENKAMP A, HART RJ, JUUL A. Environmental factors in declining human fertility. **Nat Rev Endocrinol**, v.18, n. 3, p. 139-157, 2022.

SENGUPTA P, BORGES E JR, DUTTA S, KRAJEWSKA-KULAK E. Decline in sperm count in European men during the past 50 years. **Hum Exp Toxicol**, v. 37, n. 3, p. 247-255, 2018.

SENGUPTA P, NWAGHA U, DUTTA S, KRAJEWSKA-KULAK E, IZUKA E. Evidence for decreasing sperm count in African population from 1965 to 2015. **Afr Health Sci**. v. 17, n. 2, p. 418-427, 2017.

Su LJ, Zhang JH, Gomez H, et al. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. **Oxid Med Cell Longev**, 2019.

TAINTER ML, STOCKTON AB, CUTTING WC. Use of dinitrophenol in obesity and related conditions. A progress report. **Journal of the American Medical Association**, v. 101, n. 19, p. 1472-1475, 1933.

TAYLOR K, ROBERTS P, SANDERS K, BURTON P. Effect of antioxidant supplementation of cryopreservation medium on post-thaw integrity of human spermatozoa. **Reprod Biomed Online**. v. 18, n. 2, p. 184-9, 2009.

TEN J, VENDRELL FJ, CANO A, TARÍN JJ. Dietary antioxidant supplementation did not affect declining sperm function with age in the mouse but did increase head abnormalities and reduced sperm production. **Reprod Nutr Dev**, v. 37, n. 5, p. 481-92, 1997.

THOMSON LK, FLEMING SD, AITKEN RJ, DE IULIIS GN, ZIESCHANG JA, CLARK AM. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. **Human Reproduction**. v. 24, n. 9, p. 2061-70, 2009.

THOMPSON A, AGARWAL A, DU PLESSIS SS. Physiological Role of Reactive Oxygen Species in Sperm Function: A Review. Em: Parekatil SJ, Agarwal A (eds.), *Antioxidants in Male Infertility: A Guide for Clinicians and Researchers*. New York, **Springer Science+Business Media**, p. 69–89, 2013.

THURSTON, LISA M., PAUL F. WATSON, ALAN J. MILEHAM, and WILLIAM V. HOLT. Morphologically distinct sperm subpopulations defined by Fourier shape descriptors in fresh ejaculates correlate with variation in boar semen quality following cryopreservation. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 3, p. 382-394, 2001.

TOGHIANI S, HAYATI ROUDBARI N, DASHTI GR, ROUZBEHANI S. The effects of vitamin C and menthone on acyclovir induced DNA damage in rat spermatozoa: An experimental study. **Int J Reprod Biomed**, v. 16, n. 11, p. 703-710, 2018.

TRAMER F, ROCCO F, MICALI F, SANDRI G, PANFILI E. Antioxidant systems in rat epididymal spermatozoa. **Biol Reprod**. v. 9, n. 4, p. 753-8, 1998.

TWIGG J, FULTON, N AND GOMEZ E. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human

spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and the effectiveness of antioxidants. **Hum Reprod**, v. 13, p. 1429–1436, 1998.

URIBE P, MERIÑO J, MATUS CE, SCHULZ M, ZAMBRANO F, VILLEGAS JV, CONEJEROS I, TAUBERT A, HERMOSILLA C, SÁNCHEZ R. Autophagy is activated in human spermatozoa subjected to oxidative stress and its inhibition impairs sperm quality and promotes cell death. **Hum Reprod**, v. 37, n. 4, p. 680-695, 2022.

VAN TRAN L, MALLA BA, KUMAR S, TYAGI AK. Polyunsaturated Fatty Acids in Male Ruminant Reproduction - A Review. **Asian-Australas J Anim Sci**, v. 30, n. 5, p. 622-637, 2017.

VIZIACK, Mariana Pallú. **Efeito de diferentes biotécnicas reprodutivas (IA, TE e FIV) no desempenho produtivo e reprodutivo de fêmeas da raça Holandesa**. 2020. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Waites, G. M. H. (1970). Temperature regulation and the testis. **Development, anatomy, and physiology**, p. 241-279, 1970.

WANG AW, ZHANG H, IKEMOTO I, ANDERSON DJ, LOUGHLIN KR. Reactive oxygen species generation by seminal cells during cryopreservation. **Urology**, v. 49, n. 6, p. 921-5, 1997.

WEI YH, LU CY, WEI CY, MA YS, LEE HC. Oxidative stress in human aging and mitochondrial disease-consequences of defective mitochondrial respiration and impaired antioxidant enzyme system. **Chin J Physiol**. v. 44, n. 1, p. 1-11, 2001.

WOLKERS WF, OLDENHOF H. Principles Underlying Cryopreservation and Freeze-Drying of Cells and Tissues. **Methods Mol Biol**. p. 3-25, 2021.

WOLKERS, W. F., BALASUBRAMANIAN, S. K., ONGSTAD, E. L., ZEC, H. C., & BISCHOF, J. C. Effects of freezing on membranes and proteins in LNCaP prostate tumor cells. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1768, n. 3, p. 728–736, 2007.

YILDIZ C, KAYA A, AKSOY M, TEKELI T. Influence of sugar supplementation of the extender on motility, viability and acrosomal integrity of dog spermatozoa during freezing. **Theriogenology**, v. 54, n. 4, p. 579-85, 2000.

ZHAO, R., JIANG, S., ZHANG, L., & YU, Z. Mitochondrial electron transport chain, ROS generation and uncoupling (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 44, p. 3-15, 2019.

ZHU Z, FAN X, LV Y, LIN Y, WU D, ZENG W. Glutamine protects rabbit spermatozoa against oxidative stress via glutathione synthesis during cryopreservation. **Reprod Fertil Dev**. v. 29, n. 11, p. 2183-2194, 2017.

ZINI A, DEFREITAS G, FREEMAN M, HECHTER S, JARVI K. Varicocele is associated with abnormal retention of cytoplasmic droplets by human spermatozoa. **Fertil Steril**, v. 74, p. 461–464, 2000.

ZOROV DB, JUHASZOVA M, SOLLOTT SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. **Physiol Rev**, v. 94, n. 3, p. 909-950, 2014.