ERIC JUN YONAMINE FUSADA

Efeitos dos desacopladores de membrana mitocondrial (CCCP, DNP E FCCP) na função espermática bovina

São Paulo 2022

ERIC JUN YONAMINE FUSADA

Efeitos dos desacopladores de membrana mitocondrial (CCCP, DNP e FCCP) na função espermática bovina

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

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração: Reprodução Animal

Orientadora:

Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção

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 Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4200 FMVZ	Fusada, Eric Jun Yonamine Efeito dos desacopladores de membrana mitocondrial (CCCP, DNP e FCCP) na função espermática bovina / Eric Jun Yonamine Fusada. – 2022. 69 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.
	Orientadora: Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção.
	1. EROs. 2. CASA. 3. Citometria de fluxo. 4. Espermatozoide. 5. Fertilidade masculina. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Camila Molgara Gamba, CRB-8/7070, da FMVZ/USP.



Comissão de Ética no Uso de Animais Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo

> São Paulo, 05 de maio de 2022 CEUAx N 9244171019

Ilmo(a). Sr(a). Responsável: Mayra Elena Ortiz D\'avila Assumpção Área: Reprodução Animal Equipe envolvida: Adriano Felipe Perez Sigueira - (colaborador); Eric Jun Yonamine Fusada - (executante); Mayra Elena Ortiz D'avila Assumpção - (orientador);

Título do projeto: "Efeitos dos desacopladores de membrana mitocondrial (CCCP, DNP e FCCP) na função espermática bovina".

Parecer Consubstanciado da CEUA FMVZ

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, na reunião de 18/06/2020, ANALISOU e APROVOU o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador: 1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.

2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.

3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

4. Relatórios parciais de andamento deverão ser enviados anualmente à CEUA até a conclusão do protocolo.

nh

bamillaffstaffender

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais de São Paulo

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

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universităria: Armando de Salles Oliveira CEP 05508-270 São Paulo(SP - Brasil - tel: 55 (11) 3091-7676 Horário de atendimento: 2ª a 5ª das 7h30 às 16h : e-mail: ceuavet@usp.br CEUA N 9244171019

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: FUSADA, Eric Jun Yonamine

Título: Efeito dos desacopladores de membrana mitocondrial (CCCP, DNP e FCCP) na função espermática bovina.

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

Data: 15/06/2022

Banca Examinadora

Prof. Dr		
Instituição:	Julgamento:	
Prof. Dr		
Instituição:	Julgamento:	
Prof. Dr		
Instituição:	Julgamento:	

Agradecimentos

Primeiramente agradeço aos meus pais e irmãos que sempre estiveram ao meu lado, fazendo de tudo ao alcance deles e me deixando mais tranquilo por saber que não estou só em nenhum momento.

Agradeço imensamente a minha orientadora, professora Mayra, que como uma mãe, por todo apoio e ensinamentos. Sempre que precisei, seja na parte acadêmica ou em assuntos pessoais, esteve ali comigo, incentivando e acolhendo. Apesar de eu ser uma pessoa mais fechada, sempre fez questão de saber como andava minha vida dentro e fora do departamento, seja para puxar minha orelha ou para acompanhar meu desenvolvimento pessoal e profissional, de forma que eu nunca ficasse desamparado.

Ao Fura, vulgo Adriano, não tenho nem palavras para agradecer. Foi quem me puxou para o laboratório e me ensinou praticamente tudo do que eu aprendi nesse período todo. Fora as risadas e conselhos pessoais tornando uma convivência mais leve e prazerosa no laboratório. Seu distanciamento do laboratório fez uma falta imensa, tanto pelas conversas, quanto pelos ensinamentos.

À Vivian do citômetro agradeço por toda ajuda e parceria na realização deste projeto. Também me ensinou muito neste período. Junto ao Fura, foram a base para o desenvolvimento do meu mestrado.

Agradeço ao professor Marcillio, Diego, Bob, Rapha, Ken, Henrique, Alvarto e demais orientados, pela ajuda no processamento das amostras do projeto. Em especial ao professor que sempre esteve aberto para ajudar desde meu estágio obrigatório.

À minha segunda família, minha mãe Joana, meu pai, Felipe e minha irmãzinha caçula Jujuba que sempre estiveram ali apoiando e festejando cada conquista. Eu tenho uma certa dificuldade para manter contato, me distancio sem nem mesmo perceber, mas apesar de distante sempre estarei ao lado de vocês para o que der e vier.

Não posso esquecer da Camilla, que se mantem como um alicerce do laboratório. Sempre em correria, mas sempre arranja um jeito de ajudar a todos. Além de nos alimentar, agradeço aos bolos de milho, sorvete de doce de leite, cookies...mesmo sendo para o Felipe em específico, todos se deliciavam.

Agradeço também à Thais, por toda ajuda nas análises e desenvolvimento do projeto. Ao Marcelo, Larissa, Paco, Carol e demais integrantes do laboratório pela ajuda e companheirismo.

Agradeço à professora Cristina Massoco que possibilitou a realização da análise de citometria no momento em que tivemos problemas técnicos no equipamento do laboratório.

E por fim, agradeço à CAPES pelo apoio financeiro aos experimentos, pela bolsa de mestrado (processo 5050000-7).

RESUMO

FUSADA, E.J.Y. Efeito dos desacopladores de membrana mitocondrial (CCCP, DNP e FCCP) na função espermática bovina. 2022. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2022.

A variável touro tem apresentado um efeito significativo nas taxas de blastocisto podendo variar entre 6,9 e 51,2%. A elucidação dos fatores responsáveis por essas diferenças de desempenho entre touros tem impulsionado diversas linhas de pesquisas dentro da produção in vitro de embriões (PIVE). O estresse oxidativo é descrito como um dos fatores que podem levar a estas baixas taxas no sistema in vitro, causado por uma elevada produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Neste estudo a hipótese testada foi de que o tratamento com desacopladores de membrana mitocondrial reduz a produção mitocondrial de EROs, porém mantém a viabilidade espermática. Os objetivos foram comparar diferentes desacopladores de membrana mitocondrial, em relação à dose e o efeito do tempo de exposição sobre os atributos espermáticos. Para tanto foram realizados tratamentos com diferentes desacopladores [Carbonil Cianeto M-Clorafenilhidrazona (CCCP), 2,4-Dinitrofenol (DNP) e Carbonil Cianeto 4-(Trifluorometoxi) Fenilhidrazona (FCCP)] no sêmen descongelado de bovinos. Os resultados demonstraram que o DNP, dentre os testados, é um desacoplador fraco. A citometria de fluxo evidenciou que o FCCP e CCCP apresentaram redução significativa (p=0,0019, p<0,001, respectivamente) de células espermáticas manifestando marcação negativa para o estresse oxidativo celular e membrana plasmática íntegra. Já a análise computadorizada (CASA) revelou acentuada queda de motilidade com a utilização dos desacopladores CCCP e FCCP, provavelmente pela supressão da produção de ATP através da ATP sintase. O estudo em questão, demonstrou que a motilidade é o atributo mais sensível para o espermatozoide quando submetido ao tratamento com os referidos desacopladores e sugere a suplementação com glicose para promover a estimulação da via glicolítica e assim manter a viabilidade e motilidade destas células. O sêmen quando tratado antes do gradiente de Percoll®, mantém a motilidade constante devido a alguma influência não diagnosticada, mesmo quando suplementada com glicose (5 μ M).

Palavras-chave: EROs, CASA, citometria de fluxo, atributos espermáticos, espermatozoide, fertilidade masculina.

ABSTRACT

FUSADA, E.J.Y. The effect of mitochondrial uncoupling (CCCP, DNP e FCCP) on bovine sperm function. 2022. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2022.

The bull variable has had a significant effect on blastocyst rates, ranging from 6.9 to 51.2%. Elucidate the factors responsible for these differences in different bull's performance has been driven several lines of research in *in vitro* embryo production (IVP). Oxidative stress is described as one of the factors that can lead to these low rates in the *in vitro* system, caused by a high production of reactive oxygen species (ROS). In this study, the hypothesis tested was that treatment with mitochondrial membrane uncouplers reduces mitochondrial production of ROS, but maintains sperm viability. The aims were compare different mitochondrial membrane uncouplers, in relation to the dose and the effect of time exposure on sperm attributes. Treatments with different uncouplers [Carbonyl Cyanide M-Chloraphenylhydrazone (CCCP), 2,4-Dinitrophenol (DNP) and Carbonyl Cyanide 4-(Trifluoromethoxy) Phenylhydrazone (FCCP)] were carried out in thawed bovine semen. The results showed that the DNP, among those tested, is a weak uncoupler. Flow cytometry demonstrated that FCCP and CCCP showed a significant reduction (p=0.0019, p<0.001, respectively) of the sperm cells negative labeled for cellular oxidative stress and intact plasma membrane. Computerized assisted analysis (CASA) revealed a decrease in motility with the use of the uncouplers CCCP and FCCP, probably due to the suppression of ATP production through ATP synthase. The study in question demonstrated that motility is the most sensitive attribute for sperm when subjected to a treatment with the aforementioned uncouplers and suggests that supplementation with glucose can promote the stimulation of the glycolytic pathway and thus maintain the viability and motility of these cells. Semen, when treated before Percoll® gradient, keeps a constant motility due to some undiagnosed influence, even when supplemented with glucose (5 μ M).

Keywords: ROS, CASA, flow cytometry, Sperm, male fertility.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema da fosforilação oxidativa	22
Figura 2 - Modelo Hipotético Gráfico	

LISTA DE TABELAS

 Tabela 24 - Parâmetros de cinética espermática para cada grupo tratamento comFCCP por 1 minuto. Média e erro padrão para cada variável analisada noexperimento 3.55

Tabela 25 - Parâmetros de cinética espermática para cada grupo de suplementação com glicose. Média e erro padrão para cada variável analisada no experimento 3. 56

LISTA DE ABREVIATURAS

- ICSI por injeção intracitoplasmática de espermatozoide
- CCCP Carbonil Cianeto M-Clorafenilhidrazona
- DNP-2,4-Dinitrofenol
- FCCP Carbonil Cianeto 4 (Trifluorometoxi) Fenilhidrazona
- CEUA Comissão de Ética de uso de Animais
- IBGE Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
- DNA Ácido Desoxirribonucleico
- LOOH Hidroperóxido Lipídico
- **RO- Radical Alcoxil**
- -OOH Radical Peroxil
- SO4 Radical Sulfato
- °C Graus Celsius
- Sp-TALP Meio TL-Sêmen
- mL mililitro
- DMSO Sulfóxido de Dimetilo
- µg micrograma
- µl microlitro
- µM micro Molar
- µm micrômetro
- nm nanômetro
- mW miliwatts
- PBS Solução Salina Tamponada Fosfatada
- ANOVA Análise de Variância
- PIV/PIVE Produção in vitro de Embriões
- IETS International Embryo Transfer Society
- EROs Espécies Reativas De Oxigênio
- ΔΨm Potencial De Membrana Mitocondrial
- CASA Computer-Assisted Semen Analysis
- VSL Velocidade Progressiva
- VCL Velocidade Curvilínea

BCF Frequência Do Batimento Do Flagelo

STR Retilinearidade

LIN Linearidade

FITC-PI Pisum sativum agglutinin associado a Propidium iodide

JC-1 5,5´,6,6´-tetrachloro-1,1´,3,3´tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide

NADH Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo

FADH2 Flavina Adenina Dinucleotídeo

ATP Adenosina Trifosfato

ADP Adenosina Difosfato

ERNs Espécies Reativas De Nitrogênio

NO· Óxido Nítrico

O2-· Ânion Superóxido

ONOO- Peroxinitrito

H2O2 Peróxido De Hidrogênio

·OH- Radical Hidroxila

SOD Superóxido Dismutase

BSA Albumina Sérica Bovina

COCs Complexo Cumulus Oophorus

PI - iodeto de propídio - 3,8-Diamino-5-[3-(diethylmethylammonio)propyl]-6-phenylphenanthridinium diiodide),

FITC-PSA - lectina da Pisum sativum conjugada com FITC

JC-1 - 5,5',6,6'-tetrachloro- 1,1',3,3'201-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine chloride

PM1- photodetector – 583 nm

PM2 - photodetector - 680 nm

PM3 - photodetector - 525 nm

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	. 19
2	REVISÃO DE LITERATURA	. 21
	 2.1 MITOCÔNDRIA E A FORMAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA 2.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS) 2.3 MITOCÔNDRIA ESPERMÁTICA E A FUNÇÃO FISIOLÓGICA DAS EROS 2.4 EFEITO DELETÉRIO DAS EROS 2.5 DESACOPLADORES DE MEMBRANA MITOCONDRIAL E SEU EFEITO 	. 21 . 22 523 . 23
	2.6 FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA X GLICÓLISE	. 24 26
3		28
4	OBJETIVOS	29
-		20
5		. 30
	 5.1 REAGENTES E SOLUÇOES 5.2 EXPERIMENTO 1: EFEITO DOS DESACOPLADORES DE MEMBRANA MITOCONDRIAL SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL NO 	. 30)
	SEMEN POS-PERCOLL®	. 30
	5.2.1 Processamento das amostras 5.2.2 Incubação do sêmen com 2.4-Dinitrofenol (DNP)	. 30 31
	5.2.3 Incubação do sêmen com Carbonil Cianeto M-Clorafenilhidrazona	. 57
	(CCCP)	. 31
	5.2.4 Incubação do sêmen com Carbonil Cianeto 4-(Trifluorometoxi) Fenilhidrazona (FCCP)	31
	5.2.5 Análise espermática	. 32
	5.3 EXPERIMENTO 2: EFEITO DOS DESACOPLADORES DE MEMBRANA MITOCONDRIAL NO SÊMEN DESCONGELADO PÓS-GRADIENTE DE	00
	5 3 1 Análise espermática	. 33 33
	5.4 EXPERIMENTO 3: EFEITO DOS DESACOPLADORES DE MEMBRANA MITOCONDRIAL NO SÊMEN DESCONGELADO PRÉ-GRADIENTE DE	
	PERCOLL® E A INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO DE GLICOSE NO MEIO	FIV
	 5.4.1 Processamento das amostras 5.4.2 Análise espermática 5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA 	36 37 37
6	RESULTADOS	. 37
	6.1 EXPERIMENTO 1	. 37
	6.2 EXPERIMENTO 2	. 40
	6.2.1 Análise de potencial de membrana mitocondrial	. 40
	6.2.2 Analise da produção de EROs pela celula espermática 6.2.3 Análise de integridade de membrana plasmática e acrossomal	.43 ⊿7
	6.2.4 Análise da motilidade espermática	. 4 7

	6.3 EXPERIMENTO 3	54
	6.3.1 Análise da motilidade espermática	54
7	DISCUSSÃO	58
8	CONCLUSÃO	62
R	EFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

Estima-se que o rebanho de bovinos no Brasil esteja por volta de 218,2 milhões de animais (IBGE de 2020), um dos maiores rebanhos do mundo. Segundo estudo da *Internacional Embryo Transfer Society* (IETS) de 2019 referente ao ano de 2018, são produzidos no mundo, mais de 1 milhão de embriões produzidos *in vitro*, dos quais nosso país tem participação em mais de 30% da produção (345 mil) e um dos países que mais transfere embriões produzidos *in vitro* do mundo, com mais de 275.000 transferências neste período.

As biotecnologias da reprodução têm avançado com objetivo otimizar ao máximo o potencial genético tanto da fêmea quanto do macho e, assim, aumentar a produção de animais geneticamente superiores em um menor intervalo de tempo. A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é a biotecnologia que consegue potencializar não só a transferência da genética do macho, com a inseminação, mas principalmente da fêmea, devido a aspiração folicular e a maturação *in vitro* que possibilita a produção de mais embriões desta fêmea em reduzido tempo.

Apesar disso, a PIVE enfrenta barreiras na homogeneidade de resultados. Apenas 40-50% dos oócitos maturados e fecundados *in vitro* se desenvolvem até a fase de blastocisto. Há evidências de que uma das fases limitantes está na etapa de fecundação *in vitro* (RIZOS *et al.*, 2002). Nesta etapa, estudos têm demonstrado um significativo efeito touro, que interfere na cinética de fecundação e no desenvolvimento embrionário (WARD et. al., 2003) e acarreta resultados que variam de 6,9 a 51,2% de blastocistos, dentre diferentes touros (PALMA *et al.*, 2004).

Uma das diferenças entre as técnicas *in vitro* e *in vivo* é a concentração elevada de 20% de oxigênio do ambiente externo, atmosférico, comparado com o uterino e oviduto (BONTEKOE *et al.*, 2012). A exposição dos gametas a um ambiente rico em gás oxigênio torna inevitável a maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).

Apesar da importância das mitocôndrias para o metabolismo espermático, durante a cadeia respiratória são produzidos metabólitos denominados espécies reativas de oxigênio (EROs), como principal o ânion superóxido (O₂^{•-}). As EROs são necessárias para ativar vários mecanismos fisiológicos reprodutivos (AITKEN *et al.*, 2004; DE LAMIRANDE *et al.*, 1998). No entanto, o desequilíbrio entre a produção de

EROs e os mecanismos antioxidantes, pode ser altamente deletério aos espermatozoides (HALLIWELL, 1999; NICHI *et al.*, 2007).

O controle da produção em excesso ou de maneira desequilibrada das espécies reativas de oxigênio vem sendo alvo de estudos nas diversas vertentes das biotecnologias reprodutivas, como, por exemplo na criopreservação (LOSANO *et al.*, 2017b) e na PIVE (CASTRO *et al.*, 2016; SIQUEIRA *et al.*, 2018, CASTIGLIONI *et al.*, 2021b).

Os desacopladores de membrana mitocondrial demonstram um alto potencial para a modulação da produção de EROs, podendo ser uma ferramenta interessante para ser utilizada nas diferentes biotecnologias (LOSANO *et al.*, 2017a; LOSANO *et al.*, 2017b). Os desacopladores de membrana mitocondrial são moléculas lipofílicas com propriedades protonóforas. Dissipando do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$ m) ou gradiente de prótons (TEREDA, 1990; BAGKOS *et al.*, 2014) por permitirem que os prótons bombeados para o espaço intermembrana retornem à matriz mitocondrial. Visto isto, este estudo buscou entender os efeitos dos desacopladores de membrana mitocondrial sobre a célula espermática, para um possível emprego deste na produção *in vitro* de embriões.

20

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MITOCÔNDRIA E A FORMAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA

A mitocôndria é uma organela responsável pela respiração celular que sintetiza ATP para a atividade celular. Esta respiração aeróbica, por meio da fosforilação oxidativa, é responsável pela produção de aproximadamente 90% da energia celular (SARASTE, 1999; COPELAND, 2002). Segundo teoria da evolução de endossimbiose, a mitocôndria há milhões de anos era uma microorganismo livre unicelular procarionte capaz de metabolizar o oxigênio. Por fagocitose ou parasitismo com uma célula eucariótica anaeróbica criou-se uma relação de endossimbiose com a célula hospedeira. Esta relação foi favorável principalmente na transição do meio atmosférico que era rico em dióxido de carbono para o atual, rico em oxigênio. Formou-se assim, um organismo mais complexo com produção energética mais eficiente do que a via glicolítica (MARGULIS, 1970; CUMMINS, 1998).

Assim como seu ancestral bacteriano, a mitocôndria contém duas membranas, externa e interna, separadas e funcionalmente distintas. O espaço delimitado entre elas é denominado espaço intermembranas e a região envolta pela membrana interna denominada de matriz mitocondrial. Apresentam também como resquício evolutivo um genoma independente circular, o DNA mitocondrial, que é uma herança genética exclusivamente materna em animais (AL RAWI *et al.*, 2011; SATO *et al.*, 2011).

As mitocôndrias passaram então a serem classificadas como organelas e desempenham diversas funções, com destaque a produção de ATP. Em sua matriz mitocondrial, as enzimas do ciclo do ácido tricarboxílico geram, via ciclo de Krebs, transportadores de elétrons (NADH e FADH₂) que carreiam elétrons para a cadeia transportadora de elétrons na membrana interna. Esta cadeia transportadora de elétrons complexos proteicos (I-IV) que por meio de reações redox sequenciais sofrem alterações conformacionais para bombear prótons (H⁺) da matriz para o espaço intermembranas (LEHNINGER *et al.*, 1995). O gradiente de prótons gera um componente químico menor (pH) e um elétrico principal, denominado potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$ m) (AMARAL *et al.*, 2013).

Os prótons acumulados no espaço intermembranas gerado pelo bombeamento de prótons por meio dos complexos I, III e IV, geram um gradiente quimio-osmótico, liberado através do complexo V ou ATP sintase que conduz a fosforilação de ADP em ATP (STOCK et al., 1999; OKUNO et al., 2011). Esse potencial eletroquímico da membrana interna também é uma característica vital da organela para importação de proteínas mitocondriais (MITCHELL, 1961; NEUPERT et al., 2007). Porém, os complexos I e III geram espécies reativas de oxigênio que podem oxidar componentes importantes das células, como lipídeos, ácidos nucleicos e proteínas (MULLER et al., 2004; MURPHY, 2009), conforme apresentado na figura 1.





Fonte: Modificado de GERALD KARP (2008).

2.2 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS)

As EROs são oxidantes altamente potentes, que abrangem tanto os radicais livres como ânion superóxido ($O_2^{-\bullet}$) e o radical hidroxila (OH⁻), quanto oxidantes que não são radicais, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (GUÉRIN *et al.*, 2001). Elas podem ser convertidas de uma para outra por mecanismos enzimáticos ou não enzimáticos.

Por reações redox, o oxigênio molecular leva a formação do ânion superóxido e, sequencialmente, no peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, para posteriormente resultar na geração de água (H₂O) (MAILLOUX, 2015). O ânion

superóxido é a primeira e mais abundante forma de EROs, que permite a redução de um elétron do oxigênio molecular por oxidorredutases mitocondriais (PETLICKI *et al.*, 1998). Por dismutação espontânea ou catalisada por superóxido dismutase (SOD) de $O_2^{-\bullet}$ forma-se peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (FUKAI *et al.*, 2011).

A última e mais potente EROs desta cascata de reações redox é o radical hidroxila, principal responsável por danos oxidativos ao DNA e que tem meia-vida relativamente curta. A reação mais conhecida da formação de OH⁻, é a reação de Haber-Weiss, catalisada por íons de ferro (HABER *et al.*, 1932). No entanto, pode ser gerado por outros mecanismos, como por exemplo, pela decomposição fotolítica (VALKO *et al.*, 2004).

Além das EROs já citadas, várias outras são capazes de causar oxidação de componentes celulares, como, óxido nítrico (NO), peroxinitrito, hidroperóxidos lipídicos (LOOH), radical alcoxil (RO-), radical peroxil (-OOH), radical sulfato (SO₄-), entre outros (ZOROV *et al.*, 2014).

2.3 MITOCÔNDRIA ESPERMÁTICA E A FUNÇÃO FISIOLÓGICA DAS EROS

A mitocôndria espermática é um maquinário biológico extremamente importante para geração de Adenosina Trifosfato (ATP) para o espermatozoide. Estão presentes na peça intermediária, dispostas na periferia dos microtúbulos da cauda (LEHTI *et al.*, 2017). Muitos estudos consideram que a principal função da mitocôndria espermática é a produção de energia para promover a motilidade necessária para desempenhar funções biológicas (ST JOHN *et al.*, 2000).

Essa organela é responsável também pela principal fonte de EROs (KOPPERS *et al.*, 2008; AGARWAL *et al.*, 2014), importantes para o processo de hiperativação espermática (DE LAMIRANDE *et al.*, 1993), capacitação espermática (AITKEN *et al.*, 2004), reação acrossomal (DE LAMIRANDE *et al.*, 1998) e na interação entre espermatozoides e zona pelúcida (AITKEN *et al.*, 1995).

2.4 EFEITO DELETÉRIO DAS EROS

Durante a fosforilação oxidativa, as espécies reativas de oxigênio (EROs) são formadas pelo ambiente mitocondrial rico em elétrons e oxigênio. A cadeia transportadora de elétrons deixa escapar alguns elétrons que se ligam ao oxigênio molecular na formação do ânion superóxido.

Porém, a produção excessiva destes radicais livres na FIV pode estar relacionada tanto à exposição a um ambiente com maior tensão de oxigênio quanto à composição dos meios utilizados durante esta etapa. Nessas condições, a fosforilação oxidativa (via aeróbica), que ocorre na mitocôndria pelo ciclo de Krebs e cadeia respiratória (FERREIRA *et al.*, 2008) é responsável pela maior produção de EROs.

Diversos trabalhos concluem que a produção de EROs em excesso é altamente deletéria, o que acarreta redução de motilidade espermática (RUIZ-PESINI *et al.*, 1998), lesão de membranas (DU PLESSIS *et al.*, 2010), queda nas taxas de clivagem e prejuízos no desenvolvimento embrionário (CASTRO *et al.*, 2016), determinando baixa eficiência na PIVE (BURRUEL *et al.*, 2013; LANE *et al.*, 2014). Outros demonstram correlação entre atividade mitocondrial prejudicada, estresse oxidativo e fragmentação de DNA espermático, que sugere uma forte interação entre essas variáveis no dano espermático (SIMÕES *et al.*, 2013; NICHI *et al.*, 2007; BARROS, 2007, BLUMER *et al.*, 2012).

Apesar da função fisiológica das EROs, qualquer desequilíbrio na sua produção e nos mecanismos antioxidantes pode levar ao estresse oxidativo, que apresenta potencial letalidade à célula espermática (AGARWAL *et al.*, 2004; DE LAMIRANDE *et al.*, 1997). O volume limitado de citoplasma proporciona a suscetibilidade do espermatozoide ao estresse oxidativo, devido a reduzida quantidade de antioxidantes e alta quantidade de ácidos poliinsaturados que apresentam baixa resistência a oxidação. A deficiência de enzimas de reparo citoplasmático impossibilita a correção dos danos causados pelo estresse oxidativo (NICHI *et al.*, 2007; AGARWAL *et al.*, 2014).

2.5 DESACOPLADORES DE MEMBRANA MITOCONDRIAL E SEU EFEITO SOBRE PRODUÇÃO DE EROS

Estudos sugerem que os desacopladores de membrana mitocondrial podem reduzir o estresse oxidativo para alguns tipos de células (MAILLOUX *et al.*, 2011; VICENT *et al.*, 2004). Na membrana mitocondrial interna pode ser encontrada

proteína transmembrana UCP-1, que catalisam o transporte de prótons através da membrana mitocondrial em contrafluxo com os complexos I, III e IV da cadeia respiratória, induzindo a redução do gradiente de prótons (JACOBSON *et al.*, 1985). Essa quebra do potencial de membrana é denominada desacoplamento mitocondrial. Por ser um mecanismo de desacoplamento endógeno, o controle desta via é rigidamente regulado, pela inativação da proteína UCP-1 quando ligada a nucleotídeos de purinas (RIAL *et al.*, 1983). Os desacopladores de membrana mitocondrial endógenos que regulam o fluxo de prótons pela UCP-1, são os ácidos graxos livres que não apresentam mecanismos claros de ação. Porém, é aceito que a UPC-1, na presença de alguns ácidos graxos livres, catalisa o transporte de elétrons (JEZEK *et al.*, 2018).

Além desta via endógena, existe o desacoplamento mitocondrial pelas proteínas ANT por mecanismo ainda não estabelecido (BAND *et al.*, 2005). Essas proteínas têm como principal função catalisar a troca de ADP e ATP através da membrana mitocondrial, exportando ATP para o citosol celular.

No entanto, desacopladores mitocondriais sintéticos, como Carbonil Cianeto M-Clorafenilhidrazona (CCCP), 2,4-Dinitrofenol (DNP) e Carbonil Cianeto 4-(Trifluorometoxi) Fenilhidrazona (FCCP) têm sido empregados em estudos *in vitro*. Os desacopladores sintéticos são moléculas de ácidos fracos, lipossolúveis, com propriedades protonóforas, ou seja, moléculas que têm a capacidade de translocarse através das membranas carreando prótons (LOOMIS *et al.*, 1949). Portanto dissipam o gradiente de prótons por vias distintas dos endógenos e de forma menos seletiva (DEMINE *et al.*, 2019).

O DNP é considerado um desacoplador fraco, que foi amplamente utilizado na década de 1930 para perda de peso em tratamentos de obesidade e por atletas (LOU *et al.*, 2007; CUTTING *et al.*, 1933). Devido aos efeitos colaterais como erupções cutâneas e catarata, por vezes sendo até letal, a comercialização foi proibida em 1938 (DAMASHEK *et al.*, 1934; HORNER, 1941). O FCCP e CCCP apresentam menos estudos sobre seus efeitos, no entanto, há na literatura diversos trabalhos utilizando estes para bloquear a síntese de ATP pela fosforilação oxidativa (NISHIKAWA *et al.*, 2000; SAKAMURO *et al.*, 2016). O FCCP é descrito como potente desacoplador de membrana mitocondrial, obtendo efeito com menor tempo de exposição e menor concentração (KURUVILLA *et al.*, 2003).

Apesar da letalidade celular como desacoplador mitocondrial, há relato na literatura que a administração de uma dose baixa e aguda de FCCP e DNP é possível modular a produção EROs em células do sistema nervoso em quadro de lesão cerebral traumática, atuando como neuroprotetor em roedores (PANDYA *et al.*, 2007).

2.6 FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA X GLICÓLISE

Assim como já mencionado, as mitocôndrias são dispostas na peça intermediária para a produção energética. No entanto, trabalhos relatam que o fornecimento de ATP gerado pela fosforilação oxidativa não chega de forma eficiente na região distal da cauda, constatando a importância da glicólise para manter o padrão fisiológico da motilidade (NEVO *et al.*, 1970; DU PLESSIS *et al.*, 2015).

Contudo, alguns autores relacionam a mitocôndria como fonte principal de energia celular, desempenhando papel importante na homeostase celular e na motilidade espermática (TRAVIS *et al.*, 1998; ST JOHN, 2002). No entanto, outros trabalhos sugerem que para algumas espécies, a glicólise pode ser uma fonte importante de ATP para a motilidade espermática, sendo até superior à fosforilação oxidativa (MUKAI *et al.*, 2004; NASCIMENTO *et al.*, 2008).

Em equinos, foi demonstrado que para o espermatozoide manter motilidade necessita tanto da fosforilação oxidativa quanto da via glicolítica (DAVILA *et al.*, 2016). Assim como em ovinos, ambas vias são importantes, com a via glicolítica em destaque. Estudos relatam o bloqueio da glicólise gera perda de motilidade total, enquanto na fosforilação oxidativa, quando do uso dos desacopladores mitocondriais o mesmo não ocorre (LOSANO *et al.*, 2017a). uma abordagem interessante e possível é promover a inibição da síntese de ATP pela fosforilação oxidativa e estimulação da via glicolítica com glicose, desta forma a motilidade pode ser mantida já havendo relatos em espermatozoides humanos, murinos e bovinos (NASCIMENTO *et al.*, 2008; MUKAI *et al.*, 2004; LOSANO *et al.*, 2017b, respectivamente).

Este trabalho possui o objetivo de acrescentar maior conhecimento no uso dos desacopladores mitocondriais sobre a fisiologia da célula espermática de bovinos.

3 HIPÓTESE

Os desacopladores mitocondriais têm efeito dose-resposta sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$ m), produção de EROs e os demais atributos espermáticos. Há doses que reduzem o $\Delta\Psi$ m e a produção de EROs sem prejuízos aos demais atributos espermáticos como motilidade e integridade das membranas, conforme esquematizado na figura 2.





Fonte: FUSADA, 2022.

Legenda: Desacopladores: FCCP, CCCP ou DNP; $\Delta \Psi m$: Potencial de membrana plasmática; Atributos espermáticos: motilidade, potencial de membrana mitocondrial, resistência da cromatina, integridade da membrana plasmática e acrossomal.

4 OBJETIVOS

Objetivo geral

 Verificar o efeito de desacopladores de membrana mitocondrial (DNP, CCCP e FCCP) sobre a função espermática.

Objetivos específicos

- Estabelecer a relação dose-resposta dos desacopladores (DNP, CCCP e FCCP) sobre os atributos espermáticos (motilidade, integridade de membrana);
- Determinar doses dos desacopladores que reduzam o ΔΨm e produção de EROs sem prejudicar os demais atributos espermáticos;

5 MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo foi realizado nos Laboratórios de Biologia do Espermatozoide, no Laboratório de Andrologia e no Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia, todos nas dependências da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Comissão de Ética de Uso de Animais desta instituição, conforme o protocolo nº 7403070518.

5.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes químicos e soluções utilizados nestes experimentos são da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, E.U.A.), caso contrário o fabricante está indicado na sequência.

5.2 EXPERIMENTO 1: EFEITO DOS DESACOPLADORES DE MEMBRANA MITOCONDRIAL SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL NO SÊMEN PÓS-PERCOLL®

O experimento 1 teve como objetivo traçar as curvas dose-resposta dos tratamentos com os desacopladores de membrana mitocondrial. Para tanto, foram utilizadas palhetas de sêmen congelado de touros nelore (n=6), oriundas de Centrais de Processamento e Coleta de Sêmen. Os desacopladores de membrana mitocondrial utilizados foram o Carbonil Cianeto M-Clorafenilhidrazona (CCCP), o 2,4-Dinitrofenol (DNP) e o Carbonil Cianeto 4-Trifluorometoxi Fenilhidrazona (FCCP). Para o experimento dose resposta foram utilizadas de 6-8 diferentes concentrações (dependendo do desacoplador) com duração de tratamento de 1 minuto (somente FCCP) e 1 hora de incubação.

5.2.1 Processamento das amostras

As palhetas de sêmen foram descongeladas em água a 37 °C, por trinta segundos no descongelador de sêmen (Fertilize®). Assim como descrito por

Siqueira e colaboradores (2018), conteúdo foi gentilmente depositado sobre gradiente descontínuo de Percoll® (45% e 90%) e centrifugado a 6.600G por 5 minutos, em centrífuga aquecida para microtubos (Eppendorf®). Depois da centrifugação, o sedimento contendo as células móveis foi recuperado e ressuspendido em 1 mL de meio Sp-TALP (Parrish JJ, 1986), acrescido de 6mg/ml de albumina sérica bovina livre de ácidos graxos (BSA FAF A7511) e novamente centrifugado por três minutos a 1.100G, para lavagem e retirada de resíduos do gradiente de Percoll®. Este segundo sedimento foi ressuspendido para uma concentração final de 25 x 10^6 espermatozoides/mL de meio Sp-TALP com BSA.

5.2.2 Incubação do sêmen com 2,4-Dinitrofenol (DNP)

O desacoplador de membrana mitocondrial DNP foi preparado por diluição seriada com DMSO e Sp-TALP com 6 mg/ml de BSA livre de ácidos graxos, sendo que as soluções de uso final continham 0,05% de DMSO. O DNP é considerado um desacoplador fraco, porém é o que detém mais estudos e possui efeito menos tóxico. Para esse experimento foram utilizadas as doses de 0, 3,75, 7,5, 15, 30, 60, 120, 240 µM e incubação de 1 hora no sêmen já separado pelo gradiente de Percoll®.

5.2.3 Incubação do sêmen com Carbonil Cianeto M-Clorafenilhidrazona (CCCP)

O desacoplador de membrana mitocondrial CCCP foi preparado por diluição seriada com DMSO e Sp-TALP com 6 mg/ml de BSA livre de ácidos graxos, chegando as soluções de uso final com 0,05% de DMSO. Foram utilizadas as doses de 0, 3,75, 7,5, 15, 30, 60, 120, 240 µM e tempo de incubação de 1 hora no sêmen já separado pelo gradiente de Percoll®.

5.2.4 Incubação do sêmen com Carbonil Cianeto 4-(Trifluorometoxi) Fenilhidrazona (FCCP)

O desacoplador de membrana mitocondrial FCCP foi preparado por diluição seriada com DMSO e Sp-TALP com 6 mg/ml de BSA livre de ácidos graxos, chegando as soluções de uso final com 0,05% de DMSO. Devido a ação mais rápida e intensa deste desacoplador, foram testados com período de incubação de 1 minuto nas doses de 0, 10, 20, 40, 80, 160 µM no sêmen já separado pelo gradiente de Percoll®.

5.2.5 Análise espermática

Para todos os desacopladores, doses e tempos de incubação, a avaliação dos atributos espermáticos foi realizada utilizando a técnica de citometria de fluxo (Guava EasyCyteTM Mini System, Guava® Technologies, Hayward, CA, E.U.A.). Este equipamento possui um laser de excitação de 488 nm e emite uma radiação laser visível a 20 mW. Um total de 20.000 eventos por amostra foram analisados e os dados correspondentes às fluorescências amarela (*PM1 photodetector* – 583 nm), vermelha (*PM2 photodetector* – 680 nm) e verde (*PM3 photodetector* – 525 nm) foram registrados após amplificação logarítmica. Células duplas e debris foram excluídos utilizando *FL3-A gate* e os gráficos destes ensaios celulares foram analisados pelo software FlowJo® v10.2 (Flow Cytometry Analysis Software – Tree Star Inc., Ashland, Oregon, USA).

5.2.5.1 Ensaio do potencial de membrana mitocondrial pela sonda JC-1

A sonda fluorescente JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro- 1,1',3,3'201tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine chloride; Invitrogen, Eugene, OR, USA) determina o potencial de membrana mitocondrial. Este monômero emite fluorescência verde no caso de mitocôndrias com alto potencial de membrana e vermelha no caso de baixo potencial. A análise foi realizada conforme descrito por Siqueira *et al* (2018), 187.500 e0spermatozoides em meio Sp-TALP foram coradas com JC-1 (concentração final de 1 μ M), incubados a 37 °C durante 5 minutos, protegido da luz. Para análise no citômetro de fluxo foi adicionado 300 μ L de PBS à 37 °C. Como controle para as análises, foi realizado o teste de validação das amostras para determinar os pontos de corte. Uma amostra de sêmen foi submetida a congelação e descongelação em nitrogênio líquido por 10 vezes consecutivas para promover o rompimento das membranas celulares e analisada como controle negativo conforme descrito no experimento 1. Já o controle positivo foi utilizado o sêmen com maior potencial de membrana plasmática conhecido do laboratório. As amostras foram classificadas em porcentagem de células com alto (JC-1 alto) e baixo $\Delta\Psi$ m (JC-1 baixo).

5.3 EXPERIMENTO 2: EFEITO DOS DESACOPLADORES DE MEMBRANA MITOCONDRIAL NO SÊMEN DESCONGELADO PÓS-GRADIENTE DE PERCOLL®

Neste experimento foram utilizadas palhetas de sêmen de 5 touros (n=5) distintos e os mesmos 3 desacopladores de membrana mitocondrial. Realizado em três replicatas, no período de duas semanas.

O objetivo deste experimento foi selecionar doses de tratamento com efeito no potencial de membrana mitocondrial baseados nos resultados de dose-resposta do experimento 1. Devido à grande oscilação dos resultados obtidos, o desacoplador FCCP, que não apresentou efeito significativo, foi mantido para repetição neste experimento.

Foram selecionadas 4 concentrações de tratamento para cada desacoplador: 3,75, 15, 120, 240µM de DNP; 3,75, 7,5, 30, 120µM de CCCP; e 10, 20, 40, 160µM de FCCP com os respectivos controles. O FCCP novamente foi incubado com tempos distintos de 1 minuto e 1 hora (FCCP^{1min} e FCCP^{1h}), enquanto os demais apenas no período de 1 hora. Os tratamentos foram realizados conforme descrito no experimento 1, no entanto diferiram na análise de diferentes atributos espermáticos além do $\Delta\Psi$ m.

5.3.1 Análise espermática

5.3.1.1 Avaliação da cinética espermática

A análise da cinética espermática foi realizada utilizando o sistema CASA (*Computer Assisted Sperm Analysis*; Hamilton-Thorne®, Ivos 12.3, USA) como descrito Castro *et al.* (2016). Resumidamente, lâminas aquecidas à 37 °C foram preenchidas com 5 μ L da amostra, sendo que para a análise foram selecionados 6 campos. Os parâmetros considerados foram VAP (velocidade média do percurso), VSL (velocidade linear), VCL (velocidade curvo-linear), BCF (frequência de batida cruzada), ALH (amplitude de deslocamento lateral da cabeça), motilidade total e progressiva, porcentagem de células com movimento rápido (VAP >50 μ m/s), médio (30 μ m/s <VAP< 50 μ m/s), lento (VAP <30 μ m/s ou VSL <15 μ m/s) e estático (para VAP e VSL = 0 μ m/s).

5.3.1.2 Avaliação das membranas plasmática e acrossomal

A integridade do acrossomo e da membrana plasmática foram detectados pelas sondas fluorescentes FITC-PSA (lectina da Pisum sativum conjugada com FITC) e PI (iodeto de propídio - 3,8-Diamino-5-[3-(diethylmethylammonio)propyl]-6-phenylphenanthridinium diiodide), respectivamente. Para análise, cada amostra com 187.500 células em 37,5 μ L de meio Sp-TALP/FIV (PARRISH et. al 1986) sem agentes capacitores foram incubadas com FITC-PSA (quantidade final de 5 μ g) e com PI (concentração final de 6 μ M), simultaneamente, por 5 minutos a 37 °C, protegidas da luz. Para leitura no citômetro de fluxo foram adicionados 300 μ L de PBS a 37 °C.

5.3.1.3 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial foi analisado como descrito no experimento 1.

5.3.1.4 Avaliação do status oxidativo

5.3.1.4.1 CellRox® green

A detecção das espécies reativas de oxigênio foi realizada por meio da sonda fluorescentes CellRox® green (ThermoFisher). Esta sonda fluorescente penetra na célula e, quando oxidada pelas EROs intracelulares, se liga ao DNA emitindo uma fluorescência verde mais intensa. Para realizar esta técnica, 187.500 células foram coradas com a sonda CellRox® (concentração final de 5 μ M), a 37 °C durante 30 minutos, nos últimos 10 minutos foi adicionado PI (concentração final de 6 μ M). Para a leitura no citômetro de fluxo foi completado o volume da suspensão com 300 μ L de PBS à 37 °C.

Para análise dos dados, a população de células foi dividida em 4 quadrantes: população com ou sem integridade de membrana plasmática contendo alto *status* oxidativo (PI-CR+ e PI+CR+, respectivamente) e população com ou sem integridade de membrana plasmática contendo baixo *status* oxidativo (PI+CR-, PI-CR-). Além da análise desses quadrantes, foi analisado também, a intensidade média de fluorescência verde da população total e da população sem lesão de membrana.

5.3.1.4.2 MitoSOX Red

Para detecção de ânion superóxido (O_2^-) mitocondrial foi utilizada a sonda fluorescente MitoSOX Red (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA), seguindo protocolo descrito por Castiglioni (2021a). Esta sonda por ser lipossolúvel, atinge seletivamente a matriz mitocondrial. É altamente reativa ao ânion superóxido, mas não por outras espécies reativas de oxigênio (EROs) e nem por espécies reativas de nitrogênio (ERNs). O produto oxidado fluoresce em vermelho, após ligação aos ácidos nucleicos.

Para esta análise, 187.500 espermatozoides em meio Sp-TALP foram corados com MitoSOX Red (concentração final de 2,5 μM), incubados a 37 °C durante 20 minutos, protegido da luz. As amostras foram classificadas em porcentagem de células com alta (MitoSox +), e baixa presença de ânions superóxidos na mitocôndria (MitoSox -), além da intensidade média de fluorescência vermelha da população total. Para leitura no citômetro de fluxo foi completado o volume da suspensão com 300 μL de PBS à 37 °C.

5.4 EXPERIMENTO 3: EFEITO DOS DESACOPLADORES DE MEMBRANA MITOCONDRIAL NO SÊMEN DESCONGELADO PRÉ-GRADIENTE DE PERCOLL® E A INFLUÊNCIA DA SUPLEMENTAÇÃO DE GLICOSE NO MEIO FIV

Este experimento teve como objetivo avaliar a possibilidade de utilização deste sêmen tratado com os desacopladores de membrana mitocondrial no processo de PIVE. Para isso, o sêmen foi tratado antes da seleção por gradiente de Percoll® com objetivo de evitar carrear o desacoplador FCCP para a gota de meio FIV, visto que as EROs apresentam efeito importante nesta etapa e que os desacoplador poderia ter um efeito deletério na fecundação e para os oócitos. Uma vez observado que a motilidade espermática sofre efeito negativo do tratamento com desacoplador, foi testado também a possibilidade de suplementação com glicose, a fim de estimular a via glicolítica para obtenção de ATP utilizado para a motilidade.

Foram utilizadas palhetas de sêmen de 4 touros para o tratamento. Foi escolhido o FCCP como desacoplador mitocondrial, pelo período de incubação de 1 minuto, sendo testadas as concentrações de 0, 10, 20, 40, 80 e 160 µM.

5.4.1 Processamento das amostras

A amostras foram processadas de forma semelhante à descrita no experimento 1. Desta vez houve uma inversão no momento de tratamento, o sêmen foi tratado com FCCP após a descongelação. Depois de tratado, o sêmen foi depositado gentilmente no gradiente de Percoll® com o auxílio de pipeta.

Outra modificação, foi o meio utilizado para o preparo do Percoll® 45% e para a lavagem. Foi utilizado meio FIV (SIQUEIRA *et al.*, 2018) suplementado com 5 mM de glicose (LOSANO *et al.*, 2017b).

5.4.2 Análise espermática

5.4.2.1 Avaliação da cinética espermática

A análise computadorizada por meio do sistema CASA foi realizada conforme já descrito no experimento 2.

5.4.2.2 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial foi analisado como descrito no experimento 1.

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias, caso estas premissas não fossem obedecidas, os dados foram transformados. Foram analisados por ANOVA, considerando replicata como variável aleatória e tratamento como variável independente, intensidade de fluorescência e porcentagem de células como variável dependente. O efeito dose-resposta dos desacopladores foi testada através da regressão polinomial no programa SAS 9.3 (*Statistical Analysis System*). Foi considerado significativo p<0,05.

6 RESULTADOS

6.1 EXPERIMENTO 1

Neste experimento foi possível identificar o efeito dose-dependente dos desacopladores de membrana mitocondrial CCCP e DNP sobre o potencial de membrana mitocondrial da célula espermática bovina (p<0,05). No entanto, os resultados apresentaram bastante oscilação demonstrado pelo grau de complexidade das equações descritas nas tabelas 1 e 2.

CCCP ^{1h}	0 µM	3,75 µM	7,5 μM	15 µM	30 µM	60 µM	120 µM	240 µM	Valor de p	R²	Equação
ALTO	42,9 (±8,4)	67,6 (±3,9)	73,0 (±4,1)	66,8 (±6,4)	59,2 (±5,7)	54,7 (±9,4)	47,5 (±5,6)	58,1 (±4,6)	0,003	0,27	y = 47,26 + 4,82x - 0,27x ² + 0,005x ³ - 0,00036x ⁴ + 0,0000008x ⁵
BAIXO	57,1 (±8,4)	31,6 (±4,2)	26,9 (±4,1)	33,2 (±6,4)	40,7 (±5,7)	45,3 (±9,4)	52,4 (±5,6)	41,8 (±4,6)	0,001	0,27	y = 52,5 - 4,82x + 0,27x ² - 0,005x ³ + 0,000036x ⁴ - 0,0000008x ⁵
MALTO	319,8 (±93,3)	701,8 (±29,8)	662,3 (±56,9)	651,0 (±41,6)	407,8 (±64,3)	284,5 (±50,5)	171,5 (±21,6)	228,5 (±39,1)	<0001	0,68	y = 382,4 + 67,78x - 4,16x ² + 0,079x ³ - 0,00056x ⁴ + 0,0000012x ⁵
MBAIXO	30,1 (±3,0)	40,6 (±2,7)	43,3 (±2,4)	41,7 (±2,8)	38,5 (±3,1)	36,4 (±2,4)	36,9 (±1,5)	39,0 (±1,9)	0,0253	0,26	$y = 31,74 + 2,18x - 0,12x^{2} + 0,002x^{3} - 0,000015x^{4} + 0,0000001x^{5}$
MAMA	181,3 (±62,8)	488,3 (±34,7)	499,3 (±52,3)	450,5 (±48,9	271,1 (±51,6)	187,7 (±42,7)	106,4 (±21,4)	155,8 (±30,6)	<0001	0,64	y = 232,65 + 57,85x - 3,54x ² + 0,067x ³ - 0,00005x ⁴ + 0,0000011x ⁵

Tabela 1 - Efeito do CCCP com incubação de 1 hora sobre o potencial de membrana mitocondrial. Média e erro padrão, valor de p, R² e equação da reta para cada variável analisada no experimento 1.

Legenda: y = variável e x = concentração de CCCP. ALTO: população de espermatozoides com $\Delta \Psi m$; BAIXO: população de espermatozoides sem $\Delta \Psi m$; MALTO: fluorescência média da população de espermatozoides com $\Delta \Psi m$; MBAIXO: fluorescência média da população de espermatozoides sem $\Delta \Psi m$; MAMA: fluorescência média da população total de espermatozoides.

DNP ^{1h}	0 µM	3,75 µM	7,5 μM	15 µM	30 µM	60 µM	120 µM	240 µM	Valor de p	R ²	Equação
ALTO	44,6 (±7,8)	58,5 (±3,5)	58,8 (±6,1)	61,8 (±6,7)	62,9 (±8,1)	64,5 (±6,5)	68,8 (±4,4)	68,0 (±5,3)	0,04	0,08	y = 57,5 + 0,06x
BAIXO	55,3 (±7,9)	41,5 (±3,5)	41,1 (±6,1)	38,1 (±6,7)	37,0 (±8,1)	35,4 (±6,5)	31,9 (±4,4)	32,0 (±5,3)	0,04	0,08	y = 42,5 - 0,06x
MALTO	319,8 (±93,3)	414,0 (±55,4)	477,1 (±90,1)	528,3 (±75,0)	551,5 (±105,6)	477,3 (±61,6)	559,5 (±57,4)	527,1 (±89,5)	0,0047	0,14	y = 340,84 + 18,67x - 0,478x ² + 0,004x ³ - 0,00001x ⁴
MBAIXO	31,8 (±2,5)	30,0 (±2,9)	33,7 (±2,8)	36,0 (±3,4)	35,8 (±4,3)	36,2 (±4,0)	37,4 (±3,4)	37,2 (±4,8)	0,6		
МАМА	185,2 (±62,4)	260,6 (±43,6)	319,1 (±85,6)	358,8 (±78,1)	396,1 (±103,8)	329,0 (±58,4)	393,3 (±41,7)	382,3 (±77,8)	0,0016	0,15	y = 199,35 + 16,36x – 0,41x ² + 0,0033x ³ - 0,000008x ⁴

Tabela 2 - Efeito do DNP com incubação de 1 hora sobre o potencial de membrana mitocondrial. Média e erro padrão, valor de p, R² e equação da reta para cada variável analisada no experimento 1.

Legenda: y = variável e x = concentração de DNP. ALTO: população de espermatozoides com $\Delta \Psi m$; BAIXO: população de espermatozoides sem $\Delta \Psi m$; MALTO: fluorescência média da população de espermatozoides com $\Delta \Psi m$; MBAIXO: fluorescência média da população de espermatozoides sem $\Delta \Psi m$; MAMA: fluorescência média da população total de espermatozoides.

O desacoplador CCCP apresentou efeito significativo para todas as variáveis analisadas, tanto para as populações com (ALTO) e sem (BAIXO) ΔΨm, quanto para os respectivos valores de fluorescência média (MALTO e MBAIXO), e a média de todas as células (MAMA). Já o DNP não apresentou diferença significativa para a fluorescência média da população de células sem potencial de membrana mitocondrial (BAIXO), ou seja, células desacopladas ou mortas.

O FCCP apresentou efeito significativo apenas para a variável de células sem potencial mitocondrial, apresentando p>0,05 para as demais (tabela 3).

Ι.									
FCCP ^{1min}	0 µM	10 µM	20 µM	40 µM	80 µM	160 µM	Valor de p	R ²	Equação
ALTO	82,7 (±2,3)	65,1 (±10,6)	64,8 (±12,2)	78,5 (±3,8)	76,3 (±4,9)	73,6 (±4,1)	0,17		
BAIXO	17,3 (±2,3)	34,9 (±10,6)	35,2 (±12,2)	21,5 (±3,8)	23,6 (±4,9)	26,3 (±4,1)	0,29		
MALTO	417,5 (±49,2)	529,3 (±111,8)	490,8 (±91,4)	442,3 (±83,6)	387,5 (±87,5)	365,5 (±101,4)	0,19		
MBAIXO	37,1 (±3,2)	30,3 (±2,3)	30,2 (±2,5)	33,6 (±3,6)	36,7 (±3,3)	38,3 (±2,1)	0,0007	0,19	y = 36,9 - 0,9x + 0,03x2 - 0,0004x3 + 0,0000014x4
MAMA	350,3 (±39,1)	404,5 (±111,3)	376,6 (±95,1)	367,6 (±77,4)	319,1 (±78,3)	292,0 (±85,1)	0,58		

Tabela 3 - Efeito do FCCP com incubação de 1 minuto sobre o potencial de membrana mitocondrial. Média e erro padrão, valor de p, R² e equação da reta para cada variável analisada no experimento

Fonte: FUSADA, 2022.

Legenda: y = variável e x = concentração de FCCP. ALTO: população de espermatozoides com $\Delta \Psi m$; BAIXO: população de espermatozoides sem $\Delta \Psi m$; MALTO: fluorescência média da população de espermatozoides com $\Delta \Psi m$; MBAIXO: fluorescência média da população de espermatozoides sem $\Delta \Psi m$; MAMA: fluorescência média da população total de espermatozoides.

6.2 EXPERIMENTO 2

6.2.1 Análise de potencial de membrana mitocondrial

Com relação ao potencial de membrana mitocondrial, apesar de ser uma repetição com algumas doses a menos das utilizadas no experimento 1, o resultado desta vez não foi de acordo com o obtido no experimento anterior. Desta vez o quadro se inverteu, já que o DNP não apresentou resultados significativos (p>0,05;

tabela 4), enquanto o FCCP apresentou efeito significativo sobre o $\Delta \Psi m$ tanto na incubação de 1 minuto, quanto na de 1 hora (tabelas 5 e 6, respectivamente).

Tabela 4 - Efeito do DNP com incubação de 1 hora sobre o potencial de membrana mitocondrial. Média e erro padrão, valor de p, R² e equação da reta para cada variável analisada no experimento 2.

DNP ^{1h}	0 µM	3,75 μM	15 µM	120 µM	240 µM	Valor de p
ALTO	63,3 (±2,8)	64,1 (±1,7)	64,5 (±2,2)	64,3 (±1,6)	63,4 (±1,7)	0,9141
BAIXO	36,7 (±2,8)	35,9 (±1,7)	35,5 (±2,2)	35,7 (±1,6)	36,6 (±1,7)	0,9141
MALTO	294,3 (±25,2)	306,2 (±29,9)	325,4 (±29,2)	293,6 (±26,7)	298,9 (±23,6)	0,6084
MBAIXO	24,5 (±1,3)	23,0 (±1,2)	24,6 (±1,3)	23,9 (±1,0)	24,4 (±1,1)	0,4511
MAMA	197,7 (±18,8)	209,1 (±24,4)	221,4 (±23,0)	199,1 (±19,4)	201,1 (±18,1)	0,6022

Fonte: FUSADA, 2022.

Legenda: ALTO: população de espermatozoides com $\Delta \Psi m$; BAIXO: população de espermatozoides sem $\Delta \Psi m$; MALTO: fluorescência média da população de espermatozoides com $\Delta \Psi m$; MBAIXO: fluorescência média da população de espermatozoides sem $\Delta \Psi m$; MAMA: fluorescência média da população total de espermatozoides.

FCCP ^{1min}	0 µM	10 µM	20 µM	40 µM	160 μΜ	Valor de p	R²	Equação
ALTO	67,0 (±4,0)	70,7 (±3,1)	71,9 (±3,3)	70,4 (±2,7)	59,9 (±5,6)	0,0188	0,04	y = 5152,1 - 6,48x
BAIXO	33,0 (±4,0)	29,3 (±3,1)	28,8 (±3,3)	29,6 (±2,7)	40,0 (±5,6)	0,0241	0,04	y = 1,11 + 0,0006x
MALTO	331,3 (±36,6)	405,4 (±24,5)	397,2 (±20,6)	399,1 (±14,6)	247,4 (±26,5)	<0001	0,26	y = 355,52 + 2,12x - 0,017x ²
MBAIXO	23,9 (±0,9)	21,7 (±1,3)	23,3 (±1,3)	26,0 (±1,2)	32,8 (±1,2)	<0001	0,43	y = 23,6 - 0,18x + 0,0077x ² - 0,00004x ³
MAMA	240,0 (±31,7)	296,0 (±25,0)	297,7 (±24,7)	290,9 (±17,4)	179,2 (±26,8)	<0001	0,17	y = 259,68 + 1,64x - 0,0134x ²

Tabela 5 - Efeito do FCCP com incubação de 1 minuto sobre o potencial de membrana mitocondrial. Média e erro padrão, valor de p, R² e equação da reta para cada variável analisada no experimento 2.

Fonte: FUSADA, 2022.

Legenda: y = variável e x = concentração de FCCP. ALTO: população de espermatozoides com $\Delta \Psi m$; BAIXO: população de espermatozoides sem $\Delta \Psi m$; MALTO: fluorescência média da população de espermatozoides com $\Delta \Psi m$; MBAIXO: fluorescência média da população de espermatozoides sem $\Delta \Psi m$; MAMA: fluorescência média da população total de espermatozoides.

Tabela 6 - Efeito do FCCP com incubação de 1 hora sobre o potencial de membrana mitocondrial. Média e erro padrão, valor de p, R² e equação da reta para cada variável analisada no experimento 2.

FCCP ^{1h}	0 µM	10 µM	20 µM	40 µM	160 µM	Valor de p	R²	Equação
ALTO	54,5 (±2,8)	54,9 (±2,2)	47,5 (±3,7)	43,2 (±5,5)	29,3 (±5,5)	<0001	0,24	y = 53,00 - 0,15x
BAIXO	45,4 (±2,8)	45,0 (±2,1)	52,5 (±3,7)	56,7 (±5,5)	70,6 (±5,5)	<0001	0,24	y = 47,00 + 0,15x
MALTO	315,0 (±37,1)	309,3 (±23,0)	263,4 (±24,0)	250,0 (±28,0)	167,4 (±17,6)	<0001	0,2	y = 301,07 - 0,87x
MBAIXO	22,2 (±0,8)	20,9 (±0,9)	24,0 (±1,0)	24,7 (±1,1)	27,9 (±1,7)	<0001	0,19	y = 22,24 + 0,04x
MAMA	183,3 (±22,1)	182,8 (±18,4)	144,2 (±20,3)	136,5 (±24,6)	73,1 (±13,5)	<0001	0,2	y = 174,21 - 0,65x

Legenda: y = variável e x = concentração de FCCP. ALTO: população de espermatozoides com $\Delta \Psi m$; BAIXO: população de espermatozoides sem $\Delta \Psi m$; MALTO: fluorescência média da população de espermatozoides com $\Delta \Psi m$; MBAIXO: fluorescência média da população de espermatozoides sem $\Delta \Psi m$; MAMA: fluorescência média da população total de espermatozoides.

Nesta análise, apenas os tratamentos com DNP apresentaram efeito não significativo. Os demais tratamentos apresentaram diferença significativa para o $\Delta\Psi$ m com curvas de comportamentos semelhantes (tabelas 5 a 7).

Estes tratamentos apresentam retas decrescentes de primeiro grau para a população de células apresentando alto $\Delta\Psi$ m conforme se eleva a concentração dos tratamentos. Consequentemente, a população com baixo $\Delta\Psi$ m cresce na mesma proporção, por serem variáveis complementares.

Tabela 7 – Efeito do CCCP com incubação de 1 hora sobre o potencial de membrana mitocondrial. Média e erro padrão, valor de p, R² e equação da reta para cada variável analisada no experimento 2.

CCCP ^{1h}	0 µM	3,75 µM	7,5 μM	30 µM	120 µM	Valor de p	R²	Equação
ALTO	66,2 (±2,3)	70,7 (±1,9)	69,5 (±2,2)	66,2 (±2,0)	57,2 (±3,2)	<0001	0,19	y = 69,14 - 0,0988x
BAIXO	33,8 (±2,3)	29,3 (±1,9)	30,5 (±2,2)	33,8 (±2,0)	42,8 (±3,2)	<0001	0,19	y = 30,86 + 0,0988x
MALTO	248,4 (±24,8)	274,1 (±29,0)	296,6 (±28,3)	292,2 (±27,0)	217,1 (±20,5)	0,0018	0,07	y = 265,15 + 1,64x - 0,017x²
MBAIXO	28,2 (±1,1)	28,8 (±1,2)	27,4 (±1,0)	28,0 (±1,3)	30,9 (±0,6)	0,0036	0,06	y = 27,92 + 0,023x
MAMA	178,3 (±19,1)	204,8 (±22,5)	218,4 (±23,3)	205,5 (±21,4)	141,0 (±15,5)	<0001	0,11	y = 179,16 + 7,27x - 0,263x² + 0,0016x³

Fonte: FUSADA, 2022.

Legenda: y = variável e x = concentração de CCCP. ALTO: população de espermatozoides com $\Delta \Psi m$; BAIXO: população de espermatozoides sem $\Delta \Psi m$; MALTO: fluorescência média da população

de espermatozoides com $\Delta \Psi m$; MBAIXO: fluorescência média da população de espermatozoides sem $\Delta \Psi m$; MAMA: fluorescência média da população total de espermatozoides.

6.2.2 Análise da produção de EROs pela célula espermática

Os resultados evidenciaram que a produção de EROs pelas células espermáticas com membrana plasmática íntegra (PI-CR-) pode ser reduzida pelos desacopladores CCCP e FCCP quando incubados por 1 hora (tabelas 8 e 9, respectivamente). O tempo de tratamento por 1 minuto foi insuficiente para gerar redução das EROs nos espermatozoides tratados com FCCP (tabela 10).

Tabela 8 - Efeito do CCCP com incubação de 1 hora sobre o estresse oxidativo citoplasmático. Média e erro padrão, valor de p, R² e equação da reta para cada variável analisada no experimento 2.

-	CCCP ^{1h}	0 µM	3,75 µM	7,5 μM	30 µM	120 µM	Valor de p	R²	Equação
	PI-CR+	16,8 (±1,6)	15,4 (±1,6)	14,8 (±1,6)	15,1 (±1,5)	15,1 (±1,4)	0,0965		
	PI+CR+	7,3 (±1,0)	6,7 (±1,0)	6,4 (±1,0)	5,5 (±0,8)	5,6 (±0,9)	0,0029	0,03	y = 0,77 - 0,0043x + 0,00003x ²
	PI+CR-	22,9 (±1,9)	23,8 (±2,0)	23,2 (±2,0)	21,8 (±1,9)	21,2 (±1,8)	0,1162		
	PI-CR-	52,9 (±2,8)	54,1 (±2,7)	55,5 (±2,8)	57,5 (±2,4)	58,1 (±2,6)	0,0019	0,03	y = 53,47 + 0,18x - 0,001x ²

Fonte: FUSADA, 2022.

Legenda: y = variável e x = concentração de CCCP. PI-CR+: População de células com membrana plasmática íntegra e com estresse oxidativo citoplasmático; PI+CR+: População de células com lesão de membrana plasmática e com estresse oxidativo citoplasmático; PI+CR-: População de células com lesão de membrana plasmática e sem estresse oxidativo citoplasmático; PI-CR-: População de células com lesão de membrana plasmática e sem estresse oxidativo citoplasmático; PI-CR-: População de células com lesão de membrana plasmática e sem estresse oxidativo citoplasmático; PI-CR-: População de células com lesão de membrana plasmática e sem estresse oxidativo citoplasmático; PI-CR-: População de células com membrana plasmática (ntegra e sem estresse oxidativo citoplasmático.

Tabela 9 - Efeito do FCCP com incubação de 1 hora sobre o estresse oxidativo citoplasmático. Média e erro padrão, valor de p, R² e equação da reta para cada variável analisada no experimento 2.

FCCP ^{1h}	0 µM	10 µM	20 µM	40 µM	160 µM	Valor de p	R²	Equação
PI-CR+	6,0 (±1,0)	3,6 (±0,4)	4,2 (±0,7)	3,5 (±0,5)	3,3 (±0,6)	<0001	0,08	y = 5,31 - 0,065x + 0,00033x²
PI+CR+	42,3 (±2,5)	37,6 (±2,7)	38,9 (±2,7)	36,1 (±2,5)	32,4 (±2,5)	<0001	0,09	y = 41,25 - 0,162x + 0,00067x ²
PI+CR-	9,8 (±1,3)	8,5 (±1,2)	7,7 (±1,0)	7,2 (±0,9)	6,9 (±0,9)	0,0003	0,06	y = 9,544 - 0,081x + 0,0004x²
PI-CR-	41,8 (±2,8)	50,2 (±2,2)	49,2 (±3,0)	53,2 (±2,6)	57,3 (±2,8)	<0001	0,18	y = 43,88 - 0,31x - 0,0014x ²

Fonte: FUSADA, 2022.

Legenda: y = variável e x = concentração de FCCP. PI-CR+: População de células com membrana plasmática (ntegra e com estresse oxidativo citoplasmático; PI+CR+: População de células com lesão

de membrana plasmática e com estresse oxidativo citoplasmático; PI+CR-: População de células com lesão de membrana plasmática e sem estresse oxidativo citoplasmático; PI-CR-: População de células com membrana plasmática íntegra e sem estresse oxidativo citoplasmático.

FCCP ^{1min}	0 µM	10 µM	20 µM	40 µM	160 µM	Valor de p	R²	Equação
PI-CR+	3,5 (±0,6)	2,7 (±0,4)	2,8 (±0,4)	2,6 (±0,5)	3,2 (±0,5)	0,1215		
PI+CR+	32,3 (±2,1)	42,6 (±4,7)	39,4 (±2,4)	36,9 (±2,1)	35,9 (±3,2)	0,0035	0,06	y = 33,36 + 0,86x - 0,02x ² + 0,0001x ³
PI+CR-	13,5 (±3,0)	8,7 (±1,8)	9,8 (±1,8)	9,6 (±1,9)	12,3 (±2,3)	0,0336	0,04	y = 13,1 - 0,42x + 0,01x ² -0,00005x ³
PI-CR-	50,6 (±3,5)	50,5 (±1,8)	48,4 (±1,9)	50,7 (±2,3)	48,6 (±2,9)	0,6317		

Tabela 10 - Efeito do FCCP com incubação de 1 minuto sobre o estresse oxidativo citoplasmático. Média e erro padrão, valor de p, R² e equação da reta para cada variável analisada no experimento 2.

Fonte: FUSADA, 2022.

Legenda: y = variável e x = concentração de FCCP. PI-CR+: População de células com membrana plasmática (ntegra e com estresse oxidativo citoplasmático; PI+CR+: População de células com lesão de membrana plasmática e com estresse oxidativo citoplasmático; PI+CR-: População de células com lesão de membrana plasmática e sem estresse oxidativo citoplasmático; PI-CR-: População de células com lesão de membrana plasmática e sem estresse oxidativo citoplasmático; PI-CR-: População de células com lesão de membrana plasmática e sem estresse oxidativo citoplasmático; PI-CR-: População de células com lesão de membrana plasmática e sem estresse oxidativo citoplasmático; PI-CR-: População de células com membrana plasmática (ntegra e sem estresse oxidativo citoplasmático.

Observa-se na tabela 11 que o DNP apresentou um efeito não significativo (p=0,1103) sobre a população de espermatozoides com membrana íntegra com baixo *status* oxidativo (PI-CR-) com tendência a redução desta população. E promoveu uma sutil, mas significativa (p=0,0262), redução da população com membrana plasmática íntegra com alta detecção de EROs citoplasmático (PI-CR+). Porém, apresentou aumento considerável de 1/3 na população de células detectadas com lesão de membrana e em estresse oxidativo (PI+CR+), p=0,0189.

 situ paula	0, valoi	ue p, r	e equaça	o ua rela	para caua		i anan	sada no experimento z.
DNP ^{1h}	0 µM	3,75 µM	15 µM	120 µM	240 µM	Valor de p	R²	Equação
PI-CR+	3,3 (±0,7)	2,9 (±0,7)	2,8 (±0,6)	2,7 (±0,5)	2,7 (±0,6)	0,0262	0,01	y = 3,23 - 0,04x + 0,0004x² - 0,000001x³
PI+CR+	30,1 (±2,5)	34,4 (±3,5)	33,5 (±3,5)	36,3 (±3,3)	41,9 (±5,5)	0,0189	0,06	y = 32,27 + 0,04x
PI+CR-	9,1 (±1,3)	7,3 (±1,3)	7,4 (±1,2)	6,8 (±1,2)	6,7 (±1,1)	0,0259	0,03	$y = 9,14 - 0,62x + 0,04x^2 - 0,0004x^3 + 0,000001x^4$
PI-CR-	57,4 (±3,2)	55,4 (±3,6)	56,3 (±3,5)	54,2 (±3,3)	53,9 (±3,9)	0,1103		

Tabela 11 - Efeito do DNP com incubação de 1 hora sobre o estresse oxidativo citoplasmático. Média e erro padrão, valor de p, R² e equação da reta para cada variável analisada no experimento 2.

Fonte: FUSADA, 2022.

Legenda: y = variável e x = concentração de DNP. PI-CR+: População de células com membrana plasmática (ntegra e com estresse oxidativo citoplasmático; PI+CR+: População de células com lesão

de membrana plasmática e com estresse oxidativo citoplasmático; PI+CR-: População de células com lesão de membrana plasmática e sem estresse oxidativo citoplasmático; PI-CR-: População de células com membrana plasmática íntegra e sem estresse oxidativo citoplasmático.

Todos os tratamentos demonstraram uma redução na fluorescência média para as células positivas na sonda MitoSOX Red, (CCCP^{1h}: p=0.0003; DNP^{1h}: p= 0.0228; FCCP^{1min}: p=0,0048; FCCP^{1h}: p<0,0001) (tabelas 12 a 15). Ou seja, as células com presença expressiva de ânion superóxido nas mitocôndrias espermáticas, apresentaram menor teor dessa ERO. No entanto, apenas o desacoplador FCCP apresentou efeito sobre a produção de ânions superóxidos pelas mitocôndrias, sugerindo que no início do desacoplamento mitocondrial a produção é aumentada representado pelo tratamento de 1 minuto e com o decorrer do tempo, gera uma branda redução observada no tratamento com incubação de 1 hora.

Tabela 12 - Efeito do CCCP com incubação de 1 hora sobre o estresse oxidativo mitocondrial. Média e erro padrão, valor de p, R² e equação da reta para cada variável analisada no experimento 2.

CCCP ^{1h}	0 µM	3,75 µM	7,5 µM	30 µM	120 µM	Valor de p	R²	Equação
MIT+	26,7 (±3,0)	26,5 (±2,8)	26,5 (±2,9)	27,4 (±3,4)	26,5 (±3,5)	0,9175		
MIT-	73,3 (±3,0)	73,5 (±2,8)	73,4 (±2,9)	72,5 (±3,4)	73,5 (±3,5)	0,9669		
MMIT+	26,5 (±1,1)	24,3 (±0,5)	24,2 (±0,5)	23,7 (±0,5)	23,7 (±0,5)	0,0003	0,12	y = 0,0015 + 0,00004x - 0,0000013x ² + 0,00000008x ³
MMIT-	7,7 (±0,3)	7,8 (±0,3)	7,8 (±0,3)	7,9 (±0,3)	7,9 (±0,3)	0,002	0,007	$y = 7,7 + 0,025x - 0,0007x^2 + 0,000004x^3$

Fonte: FUSADA, 2022.

Legenda: y = variável e x = concentração de CCCP. MIT+: população de células com alto nível de ânion superóxido mitocondrial; MIT-: população de células com baixo nível de ânion superóxido mitocondrial; MMIT+: fluorescência média da população de células com alto nível de ânion superóxido mitocondrial; MMIT-: população de células com baixo nível de ânion superóxido mitocondrial.

DNP ^{1h}	0 µM	3,75 µM	15 µM	120 µM	240 µM	Valor de p	R²	Equação
MIT+	35,3 (±4,1)	35,1 (±3,7)	37,5 (±4,1)	36,3 (±4,2)	40,7 (±4,5)	0,1005		
MIT-	64,7 (±4,1)	64,9 (±3,7)	62,5 (±4,1)	63,7 (±4,2)	59,3 (±4,5)	0,1007		
MMIT+	29,5 (±0,7)	29,4 (±1,7)	26,7 (±0,8)	25,9 (±1,1)	27,5 (±1,2)	0,0228	0,07	y = 28,9 - 0,05x + 0,00018x ²
MMIT-	7,8 (±0,3)	7,7 (±0,3)	7,9 (±0,3)	7,9 (±0,3)	8,0 (±0,4)	0,4119		_

Tabela 13 - Efeito do DNP com incubação de 1 hora sobre o estresse oxidativo mitocondrial. Média e erro padrão, valor de p, R² e equação da reta para cada variável analisada no experimento 2.

Legenda: y = variável e x = concentração de DNP. MIT+: população de células com alto nível de ânion superóxido mitocondrial; MIT-: população de células com baixo nível de ânion superóxido mitocondrial; MMIT+: fluorescência média da população de células com alto nível de ânion superóxido mitocondrial; MMIT-: população de células com baixo nível de ânion superóxido mitocondrial.

Tabela 14 - Efeito do FCCP com incubação de 1 minuto sobre o estresse oxidativo mitocondrial. Média e erro padrão, valor de p, R² e equação da reta para cada variável analisada no experimento 2.

FCCP ^{1min}	0 µM	10 µM	20 µM	40 µM	160 µM	Valor de p	R²	Equação
MIT+	26,6 (±2,2)	33,6 (±4,1)	34,9 (±5,1)	36,6 (±4,9)	45,1 (±6,0)	0,0075	0,08	y = 31,14 + 0,09x
MIT-	73,3 (±2,2)	66,3 (±4,1)	65,1 (±5,1)	63,4 (±4,9)	54,9 (±6,0)	0,0011	0,08	y = 68,85 - 0,09x
MMIT+	30,0 (±1,8)	26,9 (±0,9)	26,5 (±1,0)	26,1 (±1,1)	25,2 (±1,3)	0,0048	0,05	y = 27,8 – 0,018x
MMIT-	6,9 (±0,1)	7,4 (±0,3)	7,7 (±0,3)	8,0 (±0,3)	8,7 (±0,3)	<0001	0,27	y = 7,04 + 0,03x - 0,0001x ²

Fonte: FUSADA, 2022.

Legenda: y = variável e x = concentração de FCCP. MIT+: população de células com alto nível de ânion superóxido mitocondrial; MIT-: população de células com baixo nível de ânion superóxido mitocondrial; MMIT+: fluorescência média da população de células com alto nível de ânion superóxido mitocondrial; MMIT-: população de células com baixo nível de ânion superóxido mitocondrial.

FCCP ^{1h}	0 µM	10 µM	20 µM	40 µM	160 µM	Valor de p	R²	Equação
MIT+	41,9 (±4,8)	42,1 (±4,6)	42,4 (±5,0)	36,7 (±4,1)	36,4 (±4,7)	0,0043	0,01	y = 41,56 - 0,03x
MIT-	58,8 (±4,8)	57,9 (±4,6)	57,6 (±5,0)	63,3 (±4,1)	63,6 (±4,7)	0,0178	0,01	y = 58,43 + 0,03x
MMIT+	29,3 (±1,4)	25,9 (±0,9)	26,3 (±0,9)	25,5 (±0,8)	25,1 (±0,7)	<0001	0,14	y = 29,36 - 0,67x + 0,04x ² - 0,0008x ³ + 0,000003x ⁴
MMIT-	7,8 (±0,2)	8,0 (±0,2)	8,0 (±0,3)	7,8 (±0,2)	7,9 (±0,2)	0,1886		

Tabela 15 - Efeito do FCCP com incubação de 1 hora sobre o estresse oxidativo mitocondrial. Média e erro padrão, valor de p, R² e equação da reta para cada variável analisada no experimento 2.

Legenda: y = variável e x = concentração de FCCP. MIT+: população de células com alto nível de ânion superóxido mitocondrial; MIT-: população de células com baixo nível de ânion superóxido mitocondrial; MMIT+: fluorescência média da população de células com alto nível de ânion superóxido mitocondrial; MMIT-: população de células com baixo nível de ânion superóxido mitocondrial.

6.2.3 Análise de integridade de membrana plasmática e acrossomal

Houve diferença significativa na integridade acrossomal para os tratamentos com CCCP (p<0,0001) e FCCP^{1min} (p<0,0001), porém apresentou uma redução pouco expressiva (tabelas 16 e 17). Assim como para os tratamentos que apresentaram diferença significativa para integridade de membrana plasmática, como DNP (p=0,0050) e FCCP^{1min} (p=0,0125) gerou uma redução de pouca expressividade (tabelas 18 e 19, respectivamente). E até demonstrou no tratamento com FCCP^{1h} (p=0,0012) um suave aumento da população com integridade de membrana plasmática em comparação ao grupo controle, porém significativo (tabela 19).

Tabela 16 - Efeito do CCCP com incubação de 1 hora sobre a integridade de membranas plasmática e acrossomal. Média e erro padrão, valor de p, R² e equação da reta para cada variável analisada no experimento 2.

CCCP ^{1h}	0 µM	3,75 µM	7,5 μM	30 µM	120 µM	Valor de p	R²	Equação
AI	83,2 (±1,6)	83,1 (±1,4)	82,2 (±1,3)	82,1 (±1,4)	79,3 (±1,3)	<0001	0,06	y = 82,99 - 0,03x
AL	16,8 (±1,6)	16,9 (±1,4)	17,7 (±1,3)	17,8 (±1,4)	20,6 (±1,3)	<0001	0,06	y = 17,00 + 0,03x
Ы	71,0 (±2,8)	72,9 (±2,3)	71,6 (±2,4	73,3 (±3,0)	69,9 (±2,4)	0,1372		
PL	29,0 (±2,8)	27,1 (±2,3)	28,3 (±2,4)	26,7 (±3,0)	30,1 (±2,4)	0,1418		

Legenda: y = variável e x = concentração de CCCP. Al: população de células com membrana acrossomal íntegra; AL: população de células com lesão de membrana acrossomal; PI: população de células com membrana plasmática íntegra; PL: população de células com lesão de membrana plasmática.

Tabela 17 - Efeito do FCCP com incubação de 1 minuto sobre a integridade de membranas plasmática e acrossomal. Média e erro padrão, valor de p, R² e equação da reta para cada variável analisada no experimento 2.

FCCP ^{1min}	0 µM	10 µM	20 µM	40 µM	160 µM	Valor de p	R²	Equação
AI	80,4 (±1,3)	79,3 (±1,5)	78,2 (±1,5)	76,7 (±1,5)	77,3 (±1,3)	<0001	0,06	y = 80,4 - 0,12x + 0,0006x ²
AL	19,6 (±1,3)	20,6 (±1,5)	21,8 (±1,5)	23,3 (±1,5)	22,6 (±1,3)	<0001	0,06	y = 19,59 + 0,12x - 0,0006x ²
Ы	75,8 (±2,9)	73,5 (±3,6)	73,7 (±3,5)	69,2 (±3,6)	70,8 (±3,1)	0,0125	0,03	y = 75,93 - 0,19x + 0,001x²
PL	24,2 (±2,9)	26,4 (±3,6)	26,3 (±3,5)	30,7 (±3,6)	29,1 (±3,1)	0,0142	0,03	y = 24,07 + 0,19x - 0,001x ²

Fonte: FUSADA, 2022.

Legenda: y = variável e x = concentração de FCCP. AI: população de células com membrana acrossomal íntegra; AL: população de células com lesão de membrana acrossomal; PI: população de células com membrana plasmática íntegra; PL: população de células com lesão de membrana plasmática.

Tabela 18- Efeito do DNP com incubação de 1 hora sobre a integridade de membranas plas	smática e
acrossomal. Média e erro padrão, valor de p, R ² e equação da reta para cada variável ana	lisada no
experimento 2.	

DNP ^{1h}	0 µM	3,75 µM	15 µM	120 µM	240 µM	Valor de p	R²	Equação
AI	82,1 (±1,3)	81,5 (±1,2)	81,1 (±1,3)	81,1 (±1,2)	80,3 (±1,3)	0,0571		
AL	17,9 (±1,3)	18,5 (±1,2)	18,9 (±1,3)	18,9 (±1,2)	19,7 (±1,3)	0,0571		
PI	69,4 (±2,4)	69,1 (±2,2)	68,0 (±2,3)	68,6 (±2,2)	66,1 (±2,5)	0,005	0,01	y = 69,06 - 0,01x
PL	30,6 (±2,4)	30,9 (±2,2)	32,0 (±2,3)	31,4 (±2,2)	33,9 (±2,5)	0,005	0,01	y = 30,94 + 0,01x

Legenda: y = variável e x = concentração de DNP. Al: população de células com membrana acrossomal íntegra; AL: população de células com lesão de membrana acrossomal; PI: população de células com membrana plasmática íntegra; PL: população de células com lesão de membrana plasmática.

Tabela 19 - Efeito do FCCP com incubação de 1 hora sobre a integridade de membranas plasmática e acrossomal. Média e erro padrão, valor de p, R² e equação da reta para cada variável analisada no experimento 2.

FCCP ^{1h}	0 µM	10 µM	20 µM	40 µM	160 µM	Valor de p	R²	Equação
AI	78,7 (±1,4)	79,0 (±1,3)	79,6 (±1,4)	79,1 (±1,4)	78,1 (±1,8)	0,4544		
AL	21,3 (±1,4)	21,0 (±1,3)	20,3 (±1,4)	20,9 (±1,4)	21,8 (±1,8)	0,4544		
Ы	66,2 (±3,3)	68,6 (±3,3)	70,9 (±3,4)	72,3 (±3,1)	71,5 (±3,3)	0,0012	0,03	y = 66,66 + 0,19x - 0,001x ²
PL	33,7 (±3,3)	31,3 (±3,3)	29,0 (±3,4)	27,6 (±3,1)	28,4 (±3,3)	0,0004	0,03	y = 33,34 - 0,19x + 0,001x²

Fonte: FUSADA, 2022.

Legenda: y = variável e x = concentração de FCCP. Al: população de células com membrana acrossomal íntegra; AL: população de células com lesão de membrana acrossomal; PI: população de células com membrana plasmática íntegra; PL: população de células com lesão de membrana plasmática.

6.2.4 Análise da motilidade espermática

Na análise pelo sistema CASA, o DNP foi o único que não gerou efeito sobre a motilidade espermática (tabela 20). Apesar do efeito não significativo, observa-se uma tendência à redução dos resultados das variáveis de velocidade (VAP, VSL, VCL) e motilidade total e progressiva e ao aumento da população de células estáticas.

Tabela 20 - Parâmetros de cinética espermática para cada grupo tratamento com DNP por 1 hora. Média e erro padrão, valor de p, R² e equação da reta para cada variável analisada no experimento 2._____

DNP ^{1h}	0 µM	3,75 µM	15 μM	120 µM	240 µM	Valor de p
VAP (µm/s)	96,1 (±3,7)	96,4 (±6,0)	99,7 (±5,7)	89,0 (±6,8)	88,3 (±5,7)	0,1228
VSL (µm/s)	88,0 (±3,5)	87,8 (±5,7)	88,7 (±5,2)	79,8 (±6,6)	79,6 (±5,6)	0,1549
VCL (µm/s)	146,0 (±5,0)	147,3 (±7,9)	152,8 (±7,7)	140,4 (±7,2)	136,7 (±7,8)	0,1284
ALH (µm)	5,4 (±0,3)	5,5 (±0,3)	5,7 (±0,3)	5,3 (±0,4)	5,4 (±0,3)	0,2677
BCF (Hertz)	36,6 (±0,9)	36,9 (±1,1)	37,4 (±1,8)	35,3 (±0,6)	33,3 (±2,5)	0,8273
STR (%)	89,2 (±0,5)	88,5 (±0,7)	87,1 (±1,2)	86,5 (±0,8)	87,9 (±1,2)	0,391
LIN (%)	59,9 (±1,3)	59,3 (±1,6)	58,1 (±1,8)	55,4 (±2,2)	59,0 (±3,0)	0,2643
Motili (%)	36,6 (±3,8)	38,2 (±5,3)	40,4 (±5,6)	34,1 (±5,6)	29,6 (±4,2)	0,5475
Progr (%)	28,4 (±3,3)	29,9 (±4,7)	30,5 (±4,8)	25,1 (±4,9)	21,8 (±3,8)	0,1324
Rápido (%)	30,6 (±3,6)	32,3 (±5,1)	33,9 (±5,4)	27,8 (±5,3)	24,3 (±4,1)	0,1665
Médio (%)	5,9 (±0,5)	5,5 (±0,8)	6,4 (±0,7)	6,3 (±0,7)	5,1 (±0,7)	0,3901
Lento (%)	15,6 (±1,7)	12,3 (±1,7)	13,6 (±1,3)	13,9 (±2,1)	12,5 (±1,5)	0,4793
Estático (%)	47,7 (±4,6)	49,5 (±5,8)	46,1 (±6,3)	51,7 (±6,5)	57,9 (±5,3)	0,1367

Legenda: VAP: velocidade média do percurso; VSL: velocidade linear; VCL: velocidade curvo-linear; ALH: amplitude de deslocamento lateral da cabeça; BCF: frequência de batimentos do flagelo; STR: retilinearidade; LIN: linearidade Motili: porcentagem de espermatozoides com motilidade; Progr: porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva; Rápido: população de espermatozoides com movimento rápido; Médio: população de espermatozoides com movimento médio; Lento: população de espermatozoides com movimento lento; Estático: população de espermatozoides sem movimento.

Enquanto, os desacopladores CCCP e FCCP, apresentam efeitos deletérios significativos para as variáveis de motilidade e velocidade espermática, com curva decrescente conforme a dose de tratamento aumenta (tabelas 21 a 23). As variáveis de cinética espermática reduzem abruptamente, caindo de 40 a 50% das amostras tratadas com a maior dose em comparação ao controle.

CCCP ^{1h}	0 µM	3,75 µM	7,5 μM	30 µM	120 µM	Valor de p	R²	Equação
VAP (µm/s)	96,1 (±3,7)	99,8 (±5,2)	94,0 (±4,7)	60,4 (±7,4)	51,8 (±7,9)	<0001	0,5	y = 44,46 - 0,86x + 0,004x ²
VSL (µm/s)	88,0 (±3,5)	90,1 (±4,9)	84,0 (±4,8)	51,1 (±6,7)	42,9 (±7,3)	<0001	0,66	y = 91,81 + 1,37x - 0,27x ² + 0,0064x ³ - 0,00003x
VCL (µm/s)	146,0 (±5,0)	155,7 (±6,5)	149,5 (±5,1)	113,3 (±13,0)	88,2 (±11,0)	<0001	0,64	y = 77,69 + 1,5x - 0,26x² + 0,0062x³ - 0,00003x
ALH (µm)	5,4 (±0,3)	5,9 (±0,3)	6,8 (±0,9)	5,9 (±0,6)	4,5 (±0,8)	<0001	0,63	y = 158,94 + 1,4x - 0,36x² + 0,0089x³ - 0,00004x
BCF (Hertz)	36,6 (±0,9)	36,4 (±0,9)	34,0 (±1,7)	28,5 (±3,3)	17,4 (±3,4)	0,0004	0,22	y = 7,32 - 0,07x + 0,0004x²
STR (%)	89,2 (±0,5)	88,0 (±0,9)	87,3 (±1,3)	71,5 (±7,6)	67,9 (±8,1)	0,0134	0,16	y = 29,44 + 0,7x - 0,08x ² + 0,0019x ³ - 0,000009x ⁴
LIN (%)	59,9 (±1,3)	57,7 (±1,8)	55,5 (±2,2)	40,1 (±4,6)	43,4 (±7,0)	<0001	0,34	y = 82,76 - 0,24x + 0,001x ²
Motili (%)	36,6 (±3,8)	37,7 (±3,8)	32,2 (±4,3)	19,5 (±3,8)	5,5 (±1,9)	<0001	0,36	y = 49,74 - 0,3x + 0,014x ²
Progr (%)	28,4 (±3,3)	29,4 (±3,3)	25,1 (±3,7)	12,0 (±2,7)	2,1 (±1,0)	<0001	0,59	y = 31,06 + 0,65x - 0,13x² + 0,0032x³ - 0,000015x ⁴
Rápido (%)	30,6 (±3,6)	32,3 (±3,7)	27,0 (±4,0)	13,9 (±3,0)	2,4 (±1,1)	<0001	0,58	y = 37,13 - 0,99x + 0,0048x ²
Médio (%)	5,9 (±0,5)	5,3 (±0,6)	5,1 (±0,4)	5,5 (±1,0)	2,9 (±1,1)	0,324		
Lento (%)	15,6 (±1,7)	13,4 (±1,2)	16,0 (±1,7)	16,8 (±3,0)	16,3 (±2,8)	<0001	0,19	y = 19,6 + 0,46x - 0,002x ²
Estático (%)	47,7 (±4,6)	48,9 (±4,0)	51,8 (±4,5)	63,7 (±5,2)	78,5 (±3,8)	0,0051	0,09	y = 39,95 + 0,086x

Tabela 21 - Parâmetros de cinética espermática para cada grupo tratamento com CCCP por 1 hora. Média e erro padrão, valor de p, R² e equação da reta para cada variável analisada no experimento 2.

Legenda: y = variável e x = concentração de CCCP. VAP: velocidade média do percurso; VSL: velocidade linear; VCL: velocidade curvo-linear; ALH: amplitude de deslocamento lateral da cabeça; BCF: frequência de batimentos do flagelo; STR: retilinearidade; LIN: linearidade Motili: porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva; Rápido: população de espermatozoides com movimento rápido; Médio: população de espermatozoides com movimento médio; Lento: população de espermatozoides com movimento lento; Estático: população de espermatozoides sem movimento.

FCCP ^{1min}	0 μΜ	10 µM	20 µM	40 µM	160 µM	Valor de p	R²	Equação
VAP (µm/s)	91,8 (±3,9)	84,6 (±4,65)	57,5 (±3,75)	48,1 (±2,82)	47,0 (±2,38)	<0001	0,5	y = 44,46 - 0,86x + 0,004x ²
VSL (µm/s)	77,7 (±4,0)	72,1 (±4,74)	46,6 (±3,32)	36,7 (±3,05)	34,5 (±2,50)	<0001	0,66	y = 91,81 + 1,37x - 0,27x ² + 0,0064x ³ - 0,00003x ⁴
VCL (µm/s)	158,9 (±5,5)	145,3 (±6,09)	106,8 (±7,02)	97,9 (±4,00)	95,6 (±3,56)	<0001	0,64	y = 77,69 + 1,5x - 0,26x ² + 0,0062x ³ - 0,00003x ⁴
ALH (µm)	7,5 (±0,2)	6,6 (±0,2)	5,6 (±0,32)	5,4 (±0,43)	5,7 (±0,59)	<0001	0,63	y = 158,94 + 1,4x - 0,36x ² + 0,0089x ³ - 0,00004x ⁴
BCF (Hertz)	29,4 (±0,74)	30,2 (±1,08)	25,1 (±1,48)	28,1 (±1,46)	26,4 (±0,94)	0,0004	0,22	y = 7,32 - 0,07x + 0,0004x ²
STR (%)	81,3 (±0,93)	82,3 (±1,33)	78,9 (±1,15)	74,1 (±1,73)	71,8 (±1,88)	0,0134	0,16	y = 29,44 + 0,7x - 0,08x ² + 0,0019x ³ - 0,00009x ⁴
LIN (%)	48 (±1,17)	49,0 (±1,64)	44,9 (±1,70)	39,0 (±1,79)	37,5 (±1,50)	<0001	0,34	y = 82,76 - 0,24x + 0,001x ²
Motili (%)	44,1 (±2,96)	37,8 (±4,20)	27,1 (±4,13)	17,0 (±2,81)	12,2 (±1,43)	<0001	0,36	y = 49,74 - 0,3x + 0,014x ²
Progr (%)	31,1 (±2,8)	26,9 (±3,89)	12,6 (±2,84)	5,1 (±1,72)	2,1 (±0,69)	<0001	0,59	y = 31,06 + 0,65x - 0,13x ² + 0,0032x ³ - 0,000015x ⁴
Rápido (%)	36,7 (±3,01)	30,6 (±4,16)	15,4 (±3,48)	6,5 (±1,93)	2,9 (±0,72)	<0001	0,58	y = 37,13 - 0,99x + 0,0048x ²
Médio (%)	7,3 (±0,66)	7,1 (±0,69)	11,6 (±1,96)	10,3 (±1,60)	9,1 (±1,31)	0,324		
Lento (%)	21,5 (±1,87)	22,9 (±2,72)	25,3 (±3,05)	36,4 (±4,55)	35,5 (±3,92)	<0001	0,19	y = 19,6 + 0,46x - 0,002x ²
Estático (%)	34,1 (±3,07)	39,5 (±3,64)	47,5 (±5,05)	46,5 (±4,91)	52,3 (±4,05)	0,0051	0,09	y = 39,95 + 0,086x

Tabela 22 - Parâmetros de cinética espermática para cada grupo tratamento com FCCP por 1 minuto. Média e erro padrão, valor de p, R² e equação da reta para cada variável analisada no experimento 2.

Legenda: y = variável e x = concentração de FCCP. VAP: velocidade média do percurso; VSL: velocidade linear; VCL: velocidade curvo-linear; ALH: amplitude de deslocamento lateral da cabeça; BCF: frequência de batimentos do flagelo; STR: retilinearidade; LIN: linearidade Motili: porcentagem de espermatozoides com motilidade; progr: porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva; Rápido: população de espermatozoides com movimento rápido; Médio: população de espermatozoides com movimento médio; Lento: população de espermatozoides com movimento lento; Estático: população de espermatozoides sem movimento.

FCCP ^{1h}	0 µM	10 µM	20 µM	40 µM	160 µM	Valor de p	R²	Equação
VAP (µm/s)	83,7 (±3,0)	79,7 (±4,3)	47,0 (±2,2)	53,8 (±2,5)	46,6 (±3,9)	<0001	0,49	y = 34,06 - 0,92x + 0,0047x ²
VSL (µm/s)	73,3 (±3,3)	69,1 (±4,4)	36,3 (±2,3)	41,0 (±2,3)	32,5 (±3,0)	<0001	0,64	y = 83,65 + 2,75x - 0,4x ² + 0,0099x ³ - 0,000046x ⁴
VCL (µm/s)	137,6 (±4,0)	136,6 (±5,1)	103,5 (±3,6)	105,7 (±4,0)	100,4 (±7,8)	<0001	0,69	y = 73,32 + 2,67x - 0,4x ² + 0,0099x ³ - 0,000045x ⁴
ALH (µm)	6,2 (±0,2)	6,2 (±0,2)	4,7 (±0,5)	5,6 (±0,6)	5,2 (±0,9)	<0001	0,34	y = 138,03 - 1,17x + 0,006x²
BCF (Hertz)	32,2 (±1,2)	33,2 (±0,7)	27,6 (±2,4)	25,1 (±2,4)	22,5 (±2,3)	0,3276		
STR (%)	84,8 (±1,2)	83,8 (±1,3)	76,1 (±1,5)	74,4 (±2,2)	63,8 (±4,8)	<0001	0,22	y = 33,24 - 0,25x + 0,011x ²
LIN (%)	53,4 (±1,5)	50,0 (±2,0)	38,6 (±1,8)	42,3 (±2,5)	32,6 (±3,2)	<0001	0,33	y = 82,09 - 0,12x
Motili (%)	33,3 (±3,3)	32,4 (±4,3)	8,7 (±1,7)	7,7 (±1,7)	6,8 (±1,7)	<0001	0,44	y = 53,4 + 0,6x - 0,12x ² + 0,0031x ³ - 0,000015x ⁴
Progr (%)	23,6 (±3,0)	21,9 (±3,6)	2,5 (±1,1)	1,8 (±0,6)	0,9 (±0,2)	<0001	0,52	y = 23,9 - 0,78x + 0,004x ²
Rápido (%)	26,3 (±3,0)	24,8 (±4,0)	3,3 (±1,2)	2,8 (±0,8)	1,7 (±0,4)	<0001	0,52	y = 26,69 - 0,84x + 0,0043x ²
Médio (%)	7,0 (±0,6)	7,6 (±0,5)	5,1 (±1,0)	4,9 (±1,1)	5,0 (±1,4)	0,0049	0,64	y = 7,32 - 0,08x + 0,0004x ²
Lento (%)	22,7 (±2,2)	22,4 (±1,9)	25,7 (±3,6)	32,6 (±4,0)	22,9 (±3,9)	0,023	0,08	y = 21,01 + 0,34x - 0,002x ²
Estático (%)	44,0 (±2,8)	45,2 (±4,6)	65,8 (±4,5)	59,7 (±5,0)	70,3 (±5,4)	<0001	0,21	y = 44,97 + 0,58x - 0,0026x ²

Tabela 23 - Parâmetros de cinética espermática para cada grupo tratamento com FCCP por 1 hora. Média e erro padrão, valor de p, R² e equação da reta para cada variável analisada no experimento 2.

Legenda: y = variável e x = concentração de FCCP. VAP: velocidade média do percurso; VSL: velocidade linear; VCL: velocidade curvo-linear; ALH: amplitude de deslocamento lateral da cabeça; BCF: frequência de batimentos do flagelo; STR: retilinearidade; LIN: linearidade Motili: porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva; Rápido: população de espermatozoides com movimento rápido; Médio: população de espermatozoides com movimento médio; Lento: população de espermatozoides com movimento lento; Estático: população de espermatozoides sem movimento.

6.3 EXPERIMENTO 3

6.3.1 Análise da motilidade espermática

Na análise pelo sistema CASA, a motilidade não apresentou diferença significativa (p>0,05) para nenhuma das variáveis de cinética espermática em relação ao tratamento de 1 minuto com FCCP (tabela 24), à suplementação com glicose (tabela 25) ou à interação entre tratamento com FCCP com a suplementação de glicose (tabela 26). Contudo, observa-se que a média de motilidade permanece praticamente constante no tratamento com ou sem suplementação de glicose.

	FCCP''''''									
	0 µM	10 µM	20 µM	40 µM	80 µM	160 µM	Valor de p			
VAP (µm/s)	106,2 (±4,9)	115,3 (±5,2)	104,3 (±4,0)	105,9 (±7,3)	102,2 (±6,6)	100,7 (±7,4)	0,6191			
VSL (µm/s)	86,5 (±3,4)	93,1 (±3,5)	84,8 (±3,0)	84,4 (±5,2)	83,7 (±4,5)	81,0 (±5,0)	0,4008			
VCL (µm/s)	185,9 (±9,6)	200,2 (±9,9)	188,2 (±8,0)	191,3 (±13,7)	178,4 (±10,9)	178,1 (±11,0)	0,7312			
ALH (µm)	8,0 (±0,4)	8,5 (±0,5)	8,1 (±0,5)	8,5 (±0,7)	7,6 (±0,4)	7,9 (±0,5)	0,8466			
BCF (Hertz)	31,6 (±1,0)	30,9 (±1,1)	30,7 (±1,1)	30,0 (±1,3)	30,9 (±1,0)	28,9 (±1,5)	0,6288			
STR (%)	79,5 (±1,3)	79,1 (±1,7)	80,0 (±1,9)	78,5 (±2,2)	80,3 (±1,6)	79,0 (±1,6)	0,9791			
LIN (%)	47,2 (±1,7)	47,2 (±2,0)	46,1 (±2,4)	45,2 (±2,2)	47,7 (±1,3)	46,2 (±1,4)	0,9381			
Motilidade (%)	72,1 (±5,6)	73,2 (±5,8)	65,2 (±8,8)	67,1 (±11,1)	67,3 (±10,2)	64,1 (±8,1)	0,9799			
Progressiva (%)	41,6 (±5,0)	44,2 (±4,0)	37,8 (±4,0)	37,4 (7,0)	39,3 (±6,4)	33,2 (±5,2)	0,8052			
Rápido (%)	53,2 (±7,2)	58,8 (±6,8)	49,5 (±6,8)	52,1 (±10,3)	51,2 (±9,2)	44,7 (±8,3)	0,9131			
Médio (%)	5,3 (±0,9)	4,3 (±0,5)	4,7 (±0,5)	4,2 (±0,7)	4,8 (±0,8)	4,6 (±0,7)	0,9313			
Lento (%)	13,3 (±3,0)	9,8 (±1,7)	11,1 (±1,9)	10,8 (±1,2)	11,3 (±1,4)	14,6 (±1,3)	0,4481			
Estático (%)	27,8 (±5,6)	26,7 (±5,8)	34,7 (±8,8)	32,8 (±11,1)	32,6 (±10,2)	35,8 (±8,1)	0,9734			

Tabela 24 - Parâmetros de cinética espermática para cada grupo tratamento com FCCP por 1 minuto. Média e erro padrão para cada variável analisada no experimento 3.

Legenda: VAP: velocidade média do percurso; VSL: velocidade linear; VCL: velocidade curvo-linear; ALH: amplitude de deslocamento lateral da cabeça; BCF: frequência de batimentos do flagelo; STR: retilinearidade; LIN: linearidade Motili: porcentagem de espermatozoides com motilidade; Progr: porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva; Rápido: população de espermatozoides com movimento rápido; Médio: população de espermatozoides com movimento médio; Lento: população de espermatozoides com movimento.

		Glicose			
	0 mM	5mM	Valor de p		
VAP (µm/s)	103,7 (±3,5)	108,0 (±3,3)	0,3842		
VSL (µm/s)	82,9 (±2,4)	88,3 (±2,3)	0,1		
VCL (µm/s)	185,3 (±6,3)	188,5 (±5,9)	0,7258		
ALH (µm)	8,0 (±0,3)	8,1 (±0,3)	0,8545		
BCF (Hertz)	30,2 (±0,7)	30,8 (±0,6)	0,5042		
STR (%)	78,6 (±1,0)	80,2 (±0,9)	0,2645		
LIN (%)	45,7 (±1,0)	47,6 (±1,0)	0,2178		
Motilidade (%)	68,7 (±4,8)	67,8 (±4,5)	0,8034		
Progressiva (%)	38,4 (±3,0)	39,6 (±3,1)	0,7852		
Rápido (%)	52,3 (±4,7)	51,0 (±4,4)	0,8434		
Médio (%)	4,7 (±0,4)	4,7 (±0,4)	1		
Lento (%)	11,7 (±1,2)	12,1 (±0,9)	0,5477		
Estático (%)	31,2 (±4,8)	32,1 (±4,5)	0,6558		

Tabela 25 - Parâmetros de cinética espermática para cada grupo de suplementação com glicose. Média e erro padrão para cada variável analisada no experimento 3.

Fonte: FUSADA, 2022.

Legenda: VAP: velocidade média do percurso; VSL: velocidade linear; VCL: velocidade curvo-linear; ALH: amplitude de deslocamento lateral da cabeça; BCF: frequência de batimentos do flagelo; STR: retilinearidade; LIN: linearidade Motili: porcentagem de espermatozoides com motilidade; Progr: porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva; Rápido: população de espermatozoides com movimento rápido; Médio: população de espermatozoides com movimento médio; Lento: população de espermatozoides com movimento lento; Estático: população de espermatozoides sem movimento.

Com glicose							Sem glicose						
FCCP ^{1min}	0 µM	10 µM	20 µM	40 µM	80 µM	160 μM	0 μM	10 µM	20 µM	40 µM	80 µM	160 μM	Valor de p
VAP (µm/s)	113,1 (±7,2)	116,5 (±9,3)	107,2 (±6,7)	112,0 (±7,9)	94,9 (±4,7)	103,9 (±11,2)	99,4 (±5,4)	114,2 (±6,1)	102,2 (±5,4)	97,7 (±13,7)	109,5 (±12,2)	97,5 (±11,1)	0,6067
VSL (µm/s)	92,8 (±4,4)	95,8 (±6,1)	88,4 (±3,5)	90,6 (±5,2)	78,8 (±3,1)	83,8 (±8,4)	80,2 (±3,0)	90,4 (±3,8)	82,1 (±4,5)	76,1 (±8,8)	88,6 (±8,3)	78,2 (±6,6)	0,3877
VCL (µm/s)	194,7 (±15,4)	200,2 (±17,1)	189,4 (±14,6)	196,9 (±15,7)	166,3 (±9,8)	183,7 (±15,3)	177,1 (±11,9)	200,3 (±13,0)	187,3 (±10,9)	183,8 (±27,8)	190,5 (±19,0)	172,5 (±18,9)	0,8043
ALH (µm)	8,2 (±0,7)	8,4 (±0,9)	8,1 (±0,7)	8,7 (±0,9)	7,0 (±0,5)	8,4 (±0,6)	7,7 (±0,5)	8,6 (±0,7)	8,1 (±0,7)	8,3 (±1,4)	8,1 (±0,6)	7,5 (±1,0)	0,845
BCF (Hertz)	31,6 (±1,8)	32,1 (±2,1)	31,6 (±1,0)	29,4 (±1,0)	32,6 (±1,5)	27,8 (±0,5)	31,6 (±1,3)	29,6 (±0,8)	30,0 (±1,8)	30,9 (±3,0)	29,2 (±0,7)	30,0 (±3,2)	0,602
STR (%)	80,2 (±2,0)	80,7 (±2,7)	81,0 (±2,0)	79,5 (±3,0)	81,5 (±2,5)	78,7 (±1,8)	78,7 (±1,8)	77,5 (±2,3)	79,2 (±3,3)	77,3 (±4,1)	79,2 (±2,2)	79,2 (±3,0)	0,9878
LIN (%)	48,5 (±2,8)	48,7 (±3,4)	47,3 (±2,4)	47,0 (±2,9)	48,5 (±2,2)	45,7 (±1,7)	46,0 (±2,1)	45,7 (±2,6)	45,2 (±4,1)	43,0 (±3,4)	47,0 (±1,5)	46,7 (±2,5)	0,9642
Motili (%)	75,7 (±8,1)	70,7 (±11,1)	62,6 (±15,0)	69,5 (±11,8)	62,2 (±13,3)	65,0 (±13,7)	68,5 (±8,4)	75,7 (±5,5)	67,2 (±12,5)	64,0 (±24,0)	72,5 (±17,1)	63,2 (±10,9)	0,9598
Progr (%)	47,2 (±7,3)	45,0 (±7,3)	37,3 (±7,2)	39,0 (±7,8)	36,0 (±8,3)	32,7 (±9,2)	36,0 (±6,5)	43,5 (±4,8)	38,2 (±5,4)	35,3 (±14,6)	42,7 (±10,8)	33,7 (±6,3)	0,9189
Rápido (%)	59,7 (±10,9)	58,0 (±12,2)	46,6 (±10,7)	52,2 (±11,3)	45,0 (±10,9)	43,5 (±13,3)	46,7 (±9,9)	59,7 (±8,1)	51,7 (±10,0)	52,0 (±22,1)	57,5 (±15,8)	46,0 (±12,1)	0,9441
Médio (%)	4,7 (±1,2)	4,0 (±0)	4,6 (±0,3)	4,7 (±1,1)	5,0 (±1,0)	5,0 (±1,4)	6,0 (±1,6)	4,7 (±1,0)	4,7 (±1,0)	3,6 (±0,8)	4,7 (±1,5)	4,2 (±0,4)	0,9068
Lento (%)	10,7 (±2,7)	8,7 (±1,5)	11,6 (±3,4)	12,7 (±1,5)	12,5 (±2,1)	16,2 (±2,1)	16,0 (±5,6)	11,0 (±3,2)	10,7 (±2,7)	8,3 (±1,2)	10,2 (±1,9)	13,0 (±1,3)	0,6227
Estático (%)	24,2 (±8,1)	29,2 (±11,1)	37,3 (±15,0)	30,5 (±11,8)	37,7 (±13,3)	35,0 (±13,7)	31,5 (±8,4)	24,2 (±,5,5)	32,7 (±12,5)	36,0 (±24,0)	27,5 (±17,1)	36,7 (±10,9)	0,8829

Tabela 26 - Parâmetros de cinética espermática para a interação do tratamento com FCCP por 1 minuto e suplementação com glicose. Média, erro padrão e valor de p para cada variável avaliada no experimento 3.

Legenda: VAP: velocidade média do percurso; VSL: velocidade linear; VCL: velocidade curvo-linear; ALH: amplitude de Fonte: FUSADA, 2022. deslocamento lateral da cabeça; BCF: frequência de batimentos do flagelo; STR: retilinearidade; LIN: linearidade Motili: porcentagem de espermatozoides com motilidade; Progr: porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva; Rápido: população de espermatozoides com movimento rápido; Médio: população de espermatozoides com movimento médio; Lento: população de espermatozoides com movimento lento; Estático: população de espermatozoides sem movimento.

7 DISCUSSÃO

Este estudo avaliou o efeito de três diferentes desacopladores de membrana mitocondrial em espermatozoides criopreservados de bovinos. O objetivo principal deste estudo foi avaliar se o tratamento com desacopladores de membrana mitocondrial no sêmen descongelado teria consequência favorável para melhorar o microambiente durante o processo de fecundação *in vitro* de embriões (FIV) ao modular o estresse oxidativo e assim, obter taxas de blastocistos mais satisfatórias com a biotécnicas de produção *in vitro* de embriões (PIVE). Tal abordagem já foi feita, entretanto os espermatozoides tratados com CCCP foram injetados no espaço intracitoplasmático (ICSI) para a fecundação de oócito. Os autores relataram efeito positivo sobre a integridade de cromossomos e uma tendência ao aumento das taxas de blastocistos, ainda que não significante (KATO *et al.*, 2015).

Os desacopladores de membrana mitocondrial, CCCP, DNP e FCCP, são moléculas lipofílicas com propriedades protonóforas capazes de promover despolarização mitocondrial (LOOMIS *et al.*, 1949; TEREDA, 1990). No entanto, no experimento 1, foi observado efeito oscilatório dos resultados com tendência a promover leve polarização, opondo ao efeito despolarizante dos desacopladores em espermatozoides murino, ovino e bovino descrito na literatura (MUKAI *et al.*, 2004; LOSANO *et al.*, 2017a; LOSANO *et al.*, 2017b; respectivamente).

No experimento 2, também foi observado efeito no $\Delta\Psi$ m, o que contradiz aos observados no experimento 1, porém desta vez condizente com a literatura, o que sugere algum erro na execução do experimento anterior. O DNP não apresentou efeito significativo no espermatozoide, divergindo de trabalhos que obtiveram efeito despolarizante em outros tipos celulares (CUNHA *et al.*, 2011). Para tentar explicar este ocorrido, uma possível hipótese seria de que o DNP, por ser um desacoplador fraco, possui potência insuficiente para despolarizar células com elevado número de mitocôndrias concentradas, como é o caso dos espermatozoides. Autores citam a existência de 50 a 75 mitocôndrias por célula espermática dispostas de forma compactada na peça intermediária (MICHAEL *et al.*, 1982; DE MARTINO *et al.*, 1979), podendo ser esse o motivo para os resultados do presente estudo não estarem em concordância a estudos prévios em que usaram células distintas.

O CCCP e FCCP^{1min} apresentaram despolarização branda, semelhante entre si. Já o FCCP^{1h}, gerou uma despolarização de maior intensidade sobre $\Delta\Psi$ m. Os desacopladores apresentaram efeito despolarizante sobre o $\Delta\Psi$ m conforme a potência de cada um descrito pela literatura, sendo DNP o mais fraco e o FCCP o mais potente (DONG *et al.*, 2010; FANG *et al.*, 2014; respectivamente). O tratamento com FCCP, neste estudo foi realizado em sêmen congelado promovendo despolarização das células espermáticas, assim como já relatado em sêmen de epidídimo bovino (LOSANO *et al.*, 2017b).

A fosforilação oxidativa tem grande responsabilidade pela produção de EROs, então o $\Delta\Psi$ m está intimamente atrelado a esta produção (KATO *et al.*, 2015). Células com alto $\Delta\Psi$ m estão mais predispostas a produzir EROs, como observado neste experimento. Células espermáticas tratadas com os desacopladores mais fracos ou em menor tempo de exposição ao tratamento, reduziram menos o $\Delta\Psi$ m e, consequentemente, apresentaram menor capacidade de reduzir o estresse oxidativo celular e mitocondrial mensurado pelas sondas CellRox green e MitoSOX red, respectivamente. Apenas os tratamentos com FCCP^{1h} e CCCP proporcionaram redução da produção de EROs, visualizado pelo aumento da população de células integras com baixo estresse oxidativo celular (tabelas 8 e 9). Houve redução da fluorescência média nas células positivas para alta presença de ânion superóxido, sugerindo redução do teor desse radical livre na mitocôndria espermática. Estes resultados corroboram com o local de ação destas moléculas, que apresentam afinidade por mitocôndrias (LOOMIS *et al.*, 1949).

Apesar do tratamento com FCCP^{1min} ter promovido redução do potencial de membrana mitocondrial, esse tratamento proporcionou aumento sutil da produção de EROs mitocondrial e da população de espermatozoides com lesão de membrana plasmática sob estresse oxidativo. Este resultado contradiz estudos que buscam pela redução do ΔΨm para modular a produção de EROs (CUNHA *et al.*, 2011; PANDYA *et al.*, 2007). No entanto, uma hipótese para esclarecer o ocorrido é a possibilidade do tratamento com os desacopladores mitocondriais ter ação deletéria, seja pela própria molécula ou pelo DMSO no qual é diluído. Esse aumento das EROs pode ser observado em um curto intervalo de tempo apesar da ação despolarizante em longo intervalo de tempo.

Outro ponto a ser discutido é a questão do tempo de incubação com o FCCP, que apresentou diferentes comportamentos de resultados. Como relatado por Koppers *et al.* (2008), as EROs podem ser geradas na cadeia transportadora de elétrons ou pela atividade da NADPH oxidase. Contudo, para a formação de EROs, necessita-se da variável tempo, que pode ter sido insuficiente na exposição de 1 minuto. Corroborando com esta hipótese, a análise com intervalo de tempo de 1 hora, apresentou resultado que sugere redução do teor de ânion superóxido mitocondrial.

A análise de integridade de membrana plasmática e acrossomal pela citometria de fluxo utilizando a sonda FITC-PSA associada ao PI, trouxe resultados que corroboram com a linha de hipóteses discutida até este ponto. Apesar dos resultados significativos apresentarem diferença pouco expressiva, os desacopladores mitocondriais de caráter mais fraco tiveram aumento nas populações com lesão de membranas plasmática (DNP) e acrossomal (CCCP). Esses desacopladores mais fracos demonstraram pior desempenho na despolarização mitocondrial e consequentemente, menor efeito sobre a produção de EROs. Assim como descrito por Du Plessis et al. (2010), as EROs são moléculas oxidantes que lesam membranas. Então, quanto menor o controle da produção de EROs, maior possibilidade de lesão de membrana as células em questão podem apresentar.

O desacoplador FCCP também apresentou efeito deletério em relação à integridade de ambas as membranas, porém apenas para o tratamento de 1 minuto. Este efeito corrobora com a hipótese da necessidade de maior intervalo de tempo para apresentar os efeitos sobre a análise, e com a hipótese do efeito deletério da própria molécula que é a mais potente ou do DMSO utilizado como diluente.

No delineamento experimental, acreditava-se que o efeito dos desacopladores de membrana mitocondrial na função espermática bovina apresentaria efeito primário no potencial de membrana mitocondrial. No entanto, ao realizar a avaliação da cinética espermática, a motilidade se mostrou o atributo espermático mais sensível. O CCCP demonstrou efeito mais intenso que o próprio FCCP, que segundo Kuruvilla *et al.* (2003), seria o desacoplador mais potente dentre estes. Com a utilização destes desacopladores, a amostra seminal chegou a

apresentar perda acima de 72% de motilidade total dentre as doses mais altas e o grupo controle.

Segundo Losano *et al.* (2017b), sêmen de epidídimo bovino tratado com FCCP também apresenta redução intensa de motilidade total. E para contornar este efeito deletério, demonstraram que a suplementação com 5 mM de glicose favorece a produção energética de ATP pela via glicolítica com capacidade de manter a motilidade espermática.

No experimento 3, foram realizadas modificações no processamento das amostras com objetivo de manter os atributos espermáticos do sêmen tratado, principalmente a motilidade, e ter a capacidade de utilização no processo de produção *in vitro* de embriões. Portanto, com a finalidade de carrear o mínimo possível de desacoplador, o sêmen neste experimento passou a ser tratado logo após a descongelação, evitando mais de uma passagem pelo gradiente de Percoll®.

Além da inversão na ordem do tratamento, foi realizado a substituição do meio Sp-TALP pelo meio FIV (SIQUEIRA *et al.*, 2018) suplementado com 5 mM de glicose (LOSANO *et al.*, 2017b), com o objetivo de deixar o procedimento mais adequado para posterior utilização do tratamento para a PIVE.

Com os resultados obtidos no experimento, optamos por prosseguir este experimento 3 com a utilização apenas do tratamento com FCCP por 1 minuto. Esta escolha foi baseada nos seguintes pontos: 1) espermatozoides são células sensíveis a luz e ao meio ambiente; 2) FCCP é uma molécula fotossensível; 3) FCCP apresenta ação mais rápida e potente; 4) processo de FIV com duração de 18h. Ou seja, quanto mais rápido o tratamento, o sêmen sofre menos dano pelo período de incubação; corre menos risco de degradar o desacoplador pela luz ambiente; e apesar de para muitas características avaliadas no experimento 2 não ter apresentado efeito significativo na incubação de 1 minuto, por muitas vezes apresentou quando avaliado em 1 hora de tratamento.

Como o processo de FIV tem duração de 18 horas, acreditou-se que as moléculas do desacoplador que presentes nas mitocôndrias pelo tratamento de 1 minuto se mantivesse, após seleção por gradiente de Percoll® e que atingiria no processo de FIV resultados semelhantes ao tratamento de 1 hora do experimento 2. No entanto, o tratamento com FCCP não apresentou diferença significativa para

variáveis de cinética espermática em relação ao tratamentos com FCCP, com glicose e nem mesmo com a interação entre esses tratamentos (p>0,05).

Este resultado difere dos obtidos por Losano *et al.* (2017b) sobre a utilização de FCCP com suplementação de glicose. Porém, há diferenças entre os trabalhos, como doses de FCCP utilizadas, tipo de amostra seminal utilizada, meio de dissolução, seleção por gradiente de Percoll®, etc. Este resultado pode ter ocorrido devido à interferência do diluidor seminal ou o meio FIV tenha causado alguma alteração ou o desacoplador deixa a mitocôndria e/ou é diluído após gradiente de Percoll®.

Porém é importante ressaltar que apesar deste resultado, mais estudos devem ser realizados com objetivo de contornar ponto de entrave, proporcionando técnicas alternativas para conseguir utilizar estes tratamentos no processo de PIVE, seja estudando os efeitos que podem atribuir ao oócito, e dependendo do resultado, tratar a gota de meio FIV gota como alternativa, ou qualquer outra forma que seja viável. Segundo Kato *et al.* (2015), a utilização de desacoplador CCCP em espermatozoide para fecundação *in vitro* é possível pela biotécnicas de ICSI.

8 CONCLUSÃO

Este estudo permite concluir que os desacopladores de membrana mitocondrial FCCP e CCCP têm efeito despolarizante sobre o potencial de membrana mitocondrial e na redução do estresse oxidativo espermático, porém apresenta a motilidade como atributo espermático mais sensível. Este tratamento associado a suplementação de glicose apresenta grande potencial de execução para manter a motilidade espermática, no entanto outro método de processamento deve ser estudado para conseguir implementar o uso dos desacopladores mitocondriais na PIVE. Mais estudos referentes sobre a utilização destes desacopladores de membrana mitocondrial em células espermáticas devem ser realizados para poder compreender melhor seus efeitos, incluindo os deletérios, e prospectar formas de agregar sua utilização nas biotécnicas reprodutivas.

REFERÊNCIAS

Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SSR, Said TM. Role of antioxidants in treatment of male infertility: an overview of the literature. Reprod BioMed Online, v.8, p.616-627, 2004.

Agarwal A, Virk G, Ong C, Du Plessis SS. Effect of oxidative stress on male Reproduction. World J Mens Health, v.32, p.1-17, 2014.

Aitken RJ, Paterson M, Fisher H, Buckingham DW, Van Duin M. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. J Cell Sci, v.108, p.2017-2025, 1995.

Aitken RJ, Ryan AL, Baker MA, McLaughlin EA. Redox activity associated with the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. Free Radic Biol Med, v.36, p.994-1010, 2004.

Al Rawi S, Louvet-Vallée S, Djeddi A, Sachse M, Culetto E, Hajjar C, Boyd L, Legouis R, Galy V. Postfertilization autophagy of sperm organelles prevents paternal mitochondrial DNA transmission. Science, v.334, p.1144–1147, 2011.

Amaral A, Lourenço B, Marques M, Ramalho-Santos J. Mitochondria functionality and sperm quality. Reproduction and Fertility, v.146, p.163-174, 2013.

Bagkos G, Koufopoulos K, Piperi C. A new model of mitochondrial membrane potencial production and storage. Med Hypotheses, v.83, n.2, p.175-181, 2014.

Barros P. Estresse oxidative e integridade do DNA em sêmen resfriado de gato-domato-pequeno (Leopardus tigrinus SCHREBER 1775). 2007.

Blumer CG, Restelli AE, Giudice PTD, Soler TB, Frajetta R, Nichi M, Bertolla RP, Cedenho AP.Effect of varicocele on sperm function and semen oxidative stress. BJU Int, v.109, p.259-265, 2012.

Bontekoe S, Mantikou E, Wely M, Seshadri S, Repping S, Mastenbroek S. Low oxygen concentrations for embryo culture in assisted reproductive technologies. Cochrane Database of Systematic Reviews, n.7, 2012.

Brand MD, Pakay JL, Ocloo A, Kokoszka J, Wallace DC, Brookes PS, Cornwall EJ. The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase contente. J Biochem, v.392, p.353–362, 2005.

Burruel V, Klooster K, Chitwood J, Ross P, Meyers S. Oxidative damage to Rhesus Macaque spermatozoa results in mitotic arrest and transcript abundance changes in early embryos. Biology of Reproduction, v.89, p.1-11, 2013.

Castiglioni VC. Efeito do potencial mitochondrial dos espermatozoides bovinos na produção *in vitro* de embriões. Tese (Doutorado em Ciências), Faculdade de

Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo, p.49, 2021a.

Castiglioni VC, Siqueira AFP, Bicudo LC, De Almeida TG, Hamilton TRS, Castro LS, Mendes CM, Nichi M, Losano JDA, Visintin JA, Assumpção MEOA. Lipid peroxidation in bull semen influences sperm traits and oxidative potential of Percoll®-selected sperm. Zygote, v.29, p.476-483, 2021b.

Castro LS, Assis PM, Siqueira AFP, Hamilton TRS, Mendes CM, Losano JDA, Nichi M, Visintin JA, Assumpção MEOA. Sperm oxidative stress is detrimental to embryo development? A dose-dependent study model and a new and more sensitive oxidative status evaluation. Hindawi Publishing Corporation. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. Art ID8213071, p12, 2016.

Copeland WC. Mitochondrial DNA, Springer, 2002.

Cummins J. Mitochondrial, DNA in mammalian reproduction. Rev Reprod, v.3, p.172-182, 1998.

Cunha FM, da Silva CCC, Cerqueira FM, Kowaltowski AJ. Mild mitochondrial uncoupling as a therapeutic strategy. Current Drug Targets, v.12, p.783-789, 2011.

Cutting WC, Mehrtens HG, Tainter ML. Actions and uses of Dinitrophenol. JAMA, v.101, p.193–195, 1933.

Dameshek W, Gargill S. Report of two cases of agranulocytosis following the use of dinitrophenol. J. Med, v.211, p.440–443, 1934.

Davila MP, Munoz PM, Bolanos JM, Stout TAE, Gadella BM, Tapia JA, Silva CB, Ferrusola CO, Pena 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, p.683–694, 2016.

De Lamirande EVE, Cagnon C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. Free Rad Biol Med, v.14, p.157–166, 1993.

De Lamirande EVE, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C. Reactive oxygen species and sperm physiology. Rev Reprod, v.2, p.48–54, 1997.

De Lamirande EVE, Tsai C, Harakat A, Gagnon C. Involvement of reactive oxygen species in human sperm arcosome reaction induced by A23187, lysophosphatidylcholine, and biological fluid ultrafiltrates. J Androl, v.19, p.585-594, 1998.

Demine S, Renard P, Arnould T. Mitochondrial uncoupling: A key controller of biological process in physiology and diseases. Cells, v.8, n.8, p.795.

Dong Q, Tollner TL, Rodemburg SE, Hill DL, VandeVoort CA. Antioxidants, Oxyrase, and mitochondrial uncoupler 2,4-dinitrophenol improved postthaw survival of rhesus

monkey sperm from ejaculates with low cryosurvival. Fertility and Sterility, v.94, n.6, 2010.

Du Plessis S, Agarwal A, Mohanty G, Van der Linde M. Oxidative phosphorylation versus glycolysis: what fuel do spermatozoa use? Asian Journal of Androl*ogy*, v.17, p.230–235, 2015.

Du Plessis SS, McAllister DA, Luu A, Savia J, Agarwal A, Lampiao F. Effects of H2O2 exposure on human sperm motility parameters, reactive oxygen species levels and nitric oxide levels. Andrologia, v.42, n.3, p.206-2010, 2010.

Fang L, Bai C, Chen Y, Dai J, Xiang Y, Ji X, Huang C, Dong Q. Inhibition of ROS production through mitochondria-targeted antioxidant and mitochondrial uncoupling increases post-thaw sperm viability in yellow catfish. Cryobiology, v.69, p.386-393, 2014.

Ferreira M, Aguiar T, Vilarinho L. Cadeia respiratória mitocondrial: Aspectos clínicos, bioquímicos, enzimáticos e moleculares associados ao défice do complexo I. Revisão, ArquiMed, 2008.

Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. Antioxid Redox Signal, v.15, p.1583–1606, 2011.

Guérin P, El Mouatassim S, Ménézo Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. Human Reproduction Update, v.7, n.2, p.175-189, 2001.

Haber F, Weiss J. über die Katalyse des Hydroperoxydes. Naturwissenshaften, v.20, p.948–950, 1932.

Halliwell B. Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford University. 1999.

Horner WD. A study of Dinitrophenol and Its relation to cataract formation. Trans Am Ophthalmol Soc, v.39, p.405–437, 1941.

IBGE, Produção da Pecuária Municipal 2020; Rio de Janeiro: IBGE, 2020. V.48, p. 1-12, 2020.

International Embryo Transfer Society (IETS). Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals Embryo Transf Newletter. [s.n.]. 2019.

Jacobsson A., Stadler U., Glotzer MA, Kozak LP. Mitocondrial uncoupling protein from mouse brown fat. Molecular cloning, genetic mapping, and mRNA expression. J. Biol. Química, v.260, p.16250–16254, 1985.

Ježek P, Holendová B, Garlid KD, Jabůrek M. Mitochondrial uncoupling proteins: Subtle regulators of cellular redox signaling. Antioxid. Redox Signal, v.29, p.667–714, 2018.

Kato Y, Nagao Y. Changes in Sperm Motility and Capacitation Induce Chromosomal Aberration of the Bovine Embryo following Intracytoplasmic Sperm Injection. PLoS ONE, v.10, n.6, e0129285, 2015.

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. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v.93, n.8, p.3199-3207, 2008.

Kuruvilla S, Qualls CW, Tyler RD, Witherspoon SM, Benavides GR, Yoon LW, Dold K, Brown RH, Sangiah S, Morgan KT. Effects of minimally toxic levels of carbonyl cyanide P-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP), elucidated through differential gene expression with biochemical and morphological correlations. Toxicol. Sci, v.73, p.348–361, 2003.

Lane M, McPherson NO, Fullston T, Spillane M, Sandeman L, Kang WX, Zander-Fox DL. Oxidative stress in mouse sperm impairs embryo development, fetal growth and alters adiposity and glucose regulation in female offspring. Plos One, v.9, n.7, p.e100832, 2014.

Lehninger AL, Nelson DL, Cox M. Princípios da Bioquímica. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 1995.

Lehti MS, Sironen A. Formation and function of sperm tail structures in association with sperm motility defects. Biol Reprod, v.97, p.522-536, 2017.

Loomis WF, Lipmann F. Inhibition of phosphorylation by azide in kidney homogenate. J Biol Chem, v.179, n.503, 1949.

Losano JDA, Angrimani DSR, Dalmazzo A, Rui BR, Brito MM, Mendes CM, Kawai GKV, Vannucchi CI, Assumpção MEOA, Barnabe VH, Nichi M. Effect of mitochondrial uncoupling and glycolysis inhibition on ram sperm functionality. Reprod Domest Anim, v.52, p.289-297, 2017a.

Losano JDA, Padín JF, Méndez-Lopez I, Angrimani DSR, García AG, Barnabe VH, Nichi M. The stimulated glycolytic pathway is able to maintain ATP levels and kinetic patterns of bovine epididymal sperm subjected to mitochondrial uncoupling. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, v.2017, 2017b.

Lou PH, Hansen BS, Olsen PH, Tullin S, Murphy MP, Brand MD. Mitochondrial uncouplers with an extraordinary dynamic range. J Biochem, v.407, p.129–140, 2007.

Lustosa AA, Barboza NA, Barbosa YGS, Rodrigues PKO, Magalhães Neto FCR. Aspectos relevantes na produção comercial de embriões bovinos por meio da técnica biotecnológica de fertilização *in vitro*: Revisão. PubVet, v.12, n.3, a.51, p.1-6, 2018.

Mailloux RJ, Harper M. Uncoupling proteins and the control of mitochondrial reactive oxygen species production. Free Rad Biol Med, v.51, p.1106-1115, 2011.

Mailloux RJ. Teaching the fundamentals of electron transfer reactions in mitochondria and the production and deletion of reactive oxygen species. Redox Biology, v.4, p.381-398, 2015.

Margulis L. Origin of Eukaryotic Cells. Evidence and Research Implications for a Theory of the Origin and Evolution of Microbial, Plant, and Animal Cells on the Precambrian Earth. Yale, University, Press: New Haven, 1970.

Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. Nature, v.191, p.144–148, 1961.

Michaels GS, Hauswirth WW, Laipis PJ. Mitochondrial DNA copy number in bovine occytes and somatic cells. Dev Biol, v.94, p.246-251, 1982.

Mukai C, Okuno M. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. Biol Reprod, v.71, p.540–547, 2004.

Muller FL, Liu Y, Van Remmen H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. J Biol Chem, v.279, p.49064–49073, 2004.

Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. Biochem J, v.417, p.1–13, 2009.

Nascimento JM, Shi LZ, Tam J, Chandsawangbhuwana C, Durrant B, Botvinick EL, Berns MW. Comparison of glycolysis and oxidative phosphorylation as energy sources for mammalian sperm motility, using the combination of fluorescence imaging, laser tweezers, and real-time automated tracking and trapping. J Cell Physiol, v.217, p.745–751, 2008.

Neupert W, Herrmann JM. Translocation of proteins into mitochondria. Rev Biochem, v.76, p.723–749, 2007.

Nevo AC, Rikmenspoel R. Diffusion of ATP in sperm flagell*a*. Journal of Theoretical Biology, v.26, p.11–18, 1970.

Nichi M, Goovaerts IG, Cortada CN, Barnabe VH, De Clercq JB, Bols PE. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on *in vitro* fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 degrees C. Theriogenology, v.67, p.334-340, 2007.

Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. Nature, v.404, p.787–790, 2000.

Okuno D, Iino R, Noji H. Rotation and structure of FoF1-ATP synthase. J. Biochem, v.149, p.655–664, 2011.

Palma GA, Sinowatz F. Male and female effects on de *in vitro* production of bovine embryos. Anatomia, Histologia, Embryologia, v.33, p.257-262, 2004.

Pandya JD, Pauly JR, Nukala VN, Sebastian AH, Day KM, Korde AS, Maragos WF, Hall ED, Sullivan PG. 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.

Parrish JJ, Susko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, First NL. Bovine *in vitro* fertilization of ruminants. J Reprod Fert uppl, v.34, p.151-65, 1986.

Petlicki J, van de Vem TGM. The equilibrium between the oxidation of hydrogen peroxide by oxygen and the dismutation of peroxyl or superoxide radicals in aqeous solutions in contact with oxygen. J Chem Soc Faraday Trans, v.94, p.2763-2767, 1998.

Rial E, Poustie A, Nicholls DG. Brown-adipose-tissue mitochondria: The regulation of the 32000-Mr uncoupling protein by fatty acids and purine nucleotides. J Biol Inorg Chem, v.137, p.197–203,1983.

Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. Mololecular Reproduction and Development, v.61, p.234-248, 2002.

Ruiz-Pesini E, Diez C, Lapeña AC, Pérez-Martos A, Monitoya J, Alvarez E, Arenas J, López-Pérez MJ. Correlation of sperm motility with mitochondrial enzymatic activities. Clinical Chemistry, v.44, n.8, p.1616-1620, 1998.

Saraste M. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. Science, v.283, p.1488-1493, 1999.

Sakamuru S, Attene-Ramos MS, Xia M. Mitochondrial Membrane Potential Assay. Methods Mol Biol, v.1473, p.17-22, 2016.

Sato M, Sato K. Degradation of paternal mitochondria by fertilization-triggered autophagy in C. elegans embryos. Science, v.334, p.1141–1144, 2011.

Simões R, Feitosa WB, Siqueira AFP, Nichi M, Paula-Lopes FF, Marques MG, Peres MA, Barnabe VH, Visintin JA, Assumpção MEOA. Influence of bovine sperm DNA fragmentation and oxidative stress on early embryo in vitro development outcome. Reproduction, v.146, p. 433-441, 2013.

Siqueira, AFP, Castro LS, Assis PM, Bicudo LC, Mendes CM, Nichi M, Visintin JA, Assumpção MEOD. Sperm traits on *in vitro* production (IVP) of bovine embryos: Too much of anything is good for nothing. PloS ONE, v.13, n.7, p.e0200273, 2018.

Siqueira AFP, Maria FS, Mendes CM, Hamilton TR, Dalmazzo A, Dreyer TR, Silva HM, Nichi M, Milazzotto MP, Visintin JA, Assumpção MEOA. Effects of photobiomodulation therapy (PBMT) on bovine sperm function. Laser in Medical Science, v.6, p.1245–1250, 2016.

St John JC. The transmission of mitochondrial, DNA following assisted reproductive techniques. Theriogenology, v.57, p.109-123, 2002.

St John JC, Sakkas D, Barratt CLR. A role for mitochondrial DNA and sperm survival. J Androl, v.21, p.189-199, 2000.

Stock D, Leslie AG, Walker JE. Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. Science, v.286, p.1700–1705, 1999.

Tereda H. Desacopladores de fosforilação oxidativa. Perspectivas de Saúde Ambiental, v.87, p.213, 1990.

Travis AJ, Foster JA, Rosenbaum NA, Visconti PE, Gerton GL, Kopf GS, Moss SB. Targeting of a germ cell-specific type 1 hexokinase lacking a poring-binding domain to the mitochondria as well as to the head and fibrous sheath of murine spermatozoa. Mol Biol Cell, v.9, p.263-276, 1998.

Valko M, Izakovc M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. Mol Cell Biochem, v.266, p.37-56, 2004.

Vicent AM, Olzmann JA, Brownlee M, Sivitz WI, Russell JW. Uncoupling proteins prevent glucose-induced neural oxidative stress and programmed cell death. Diabetes, v.53, p.726-734, 2004.

Ward F, Rizos D, Boland MP, Lonergan P. Effect of reducing sperm concentration during IVF on the ability to distinguish between bulls of high and low filed fertility: work in progress. Theriogenology, v.59, p.1575-1584, 2003.

Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS Release. Physiological Reviews, v.94, n.3, p.909-950, 2014.