



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA - BOTUCATU
DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL E RADIOLOGIA VETERINÁRIA

**ADIÇÃO DE PIRUVATO E COENZIMA Q10 AO DILUENTE À
BASE DE LEITE DESNATADO PARA REFRIGERAÇÃO DE
SÊMEN EQUINO**

Rafael dos Santos Bandeira

Botucatu – SP

Junho/2019



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA - BOTUCATU
DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL E RADIOLOGIA VETERINÁRIA

**ADIÇÃO DE PIRUVATO E COENZIMA Q10 AO DILUENTE À
BASE DE LEITE DESNATADO PARA REFRIGERAÇÃO DE
SÊMEN EQUINO**

RAFAEL DOS SANTOS BANDEIRA

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Campus de Botucatu, para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Animal, Área de Reprodução Animal.

Orientador: Dr. José Antônio Dell’Aqua Júnior

Botucatu – SP

Junho/2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA NFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Bandeira, Rafael dos Santos.

Adição de piruvato e coenzima Q10 ao diluente à base de leite desnatado para refrigeração de sêmen equino / Rafael dos Santos Bandeira. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: José Antônio Dell'Aqua Júnior

Capes: 50504002

1. Antioxidantes. 2. Criopreservação. 3. Sêmen. 4. Equino.

Palavras-chave: antioxidante; criopreservação; sêmen.

Nome do autor: Rafael dos Santos Bandeira

Título: ADIÇÃO DE PIRUVATO E COENZIMA Q10 AO DILUENTE À BASE DE LEITE DESNATADO PARA REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN EQUINO.

BANCA EXAMINADORA

Dr. José Antônio Dell'Aqua Júnior
Presidente e orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ - UNESP -
Botucatu /SP

Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa
Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ – UNESP -
Botucatu /SP

Dr. Márcio Teoro do Carmo
Membro

Central de Reprodução Equina Lub-Breeding – Cesário Lange / SP

Data da Defesa: 14 de junho de 2019.

*Dedico este trabalho à minha família, minhas irmãs Carla e Camila e em especial aos meus pais, **Walter e Maria Cleni Bandeira**, que me apoiaram em todos os momentos da vida e nunca mediram esforços para que este momento se concretizasse.*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade de seguir a trajetória que escolhi, com saúde e fé, e por ter sempre colocado pessoas iluminadas em meu caminho, o que tornou mais fácil superar todos os obstáculos encontrados.

*Aos meus pais, **Walter Eugênio Bandeira e Maria Cleni dos Santos Bandeira**, por sempre confiarem e acreditarem que eu seria capaz. Por todo carinho e amor que sempre demonstraram por mim em todos os momentos. Sem vocês nada disso seria possível. Amo vocês!*

Às minhas irmãs, Carla e Camila, que mesmo longe sempre incentivaram e demonstraram todo carinho e apoio necessário, nunca deixando esquecer o significado real da palavra irmão. Vocês são um pouco de mim e moram em meu coração.

Aos meus avós, que foram segundos pais e mães e que hoje já não estão mais entre nós para presenciarem momentos como estes, mas que com certeza de onde estiverem, estarão orgulhosos. Obrigado por tudo que fizeram por mim.

À minha noiva Mariana Gobato, pelo amor, companheirismo, paciência e ajuda em todos os momentos difíceis. Sempre serei grato por tudo o que fez e faz em minha vida. Este momento também é seu. Te amo!

À toda família Gobato (Fran, Marilú, Luís Guilherme e Stéphanie) e Mezzena pelo apoio, carinho e acolhimento. Vocês se tornaram uma segunda família, amenizando a saudade de quem tive que deixar longe para estar aqui. Minha eterna gratidão à vocês!

Ao amigo e colega Fernando Paixão Lisboa e família, por todas as oportunidades que me proporcionou e por todos os ensinamentos repassados até hoje. Saiba que tenho enorme consideração pelo profissional e principalmente pelo ser humano que sempre foi comigo. Serei eternamente grato!

Aos amigos de Ijuí, em especial ao Lucas Zardin, que sempre me incentivaram e motivaram durante toda a minha trajetória até aqui, sempre com palavras de apoio e carinho! Vocês moram no meu coração.

Aos colegas e amigos do CERAN, pelo apoio e amizade durante este período. Foram muito importantes para a realização deste trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Reprodução Animal e

Radiologia da Unesp – Botucatu, em especial ao Prof. Frederico Ozanam Papa, pelos ensinamentos e oportunidades concedidas. Muito obrigado por tudo.

Ao meu orientador José Antônio Dell’Aqua Júnior, pela credibilidade e confiança para que pudesse realizar esse trabalho. Obrigado pela oportunidade!

Agradeço a toda equipe do haras Conforto e da Central de Reprodução Marcelo Pessoa, por abrir as portas, colaboração e todo o apoio para a realização deste trabalho.

Aos animais que participaram deste experimento, vocês são uma paixão e a razão pela qual dedico o meu melhor todos os dias.

Ao CNPq, pelo apoio fornecido em forma de bolsa de estudos.

À empresa Botupharma e todos os seus funcionários, por todo material cedido para que este estudo pudesse se concretizar.

Enfim, agradeço à todos que de uma forma ou de outra colaboraram para a realização e sucesso deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Estrutura do espermatozoide.....	06
FIGURA 2 – Reação de conversão de uma molécula de glicose à duas moléculas de piruvato durante a glicólise.....	08
FIGURA 3 - Reação do complexo piruvato-desidrogenase. Conversão de duas moléculas de piruvato em duas Acetil CoA, promovendo a formação de dois NADH.....	08
FIGURA 4 - Reação do ciclo de Krebs. Formação de três NADH e uma FADH ₂ a partir de uma molécula de Acetil CoA.....	09
FIGURA 5 - Formação da adenosina trifosfato (ATP) durante o processo de fosforilação oxidativa.....	12
FIGURA 6 - Processo de reação em cadeia ocorrido na membrana plasmática durante a peroxidação lipídica. H ₂ O (água); OH [•] (radical hidroxil); RH (região estável no ácido graxo); R [•] (radical alquil); ROO [•] (radical peroxil); ROOH (hidroperóxido lipídico).....	16

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

H^+	ión hidreto
AC	adenilato-ciclase
Acetil-CoA	acetil coenzima A
ADP	adenosina difosfato
AMPc	3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico
ATP	adenosina trifosfato
$C_3H_4O_3$	piruvato
$C_6H_{12}O_6$	glicose
CAT	catalase
Cit C	citocromo C
CO_2	dióxido de carbono
DNA	ácido desoxirribonucleico
ERO	espécies reativas do oxigênio
FAD	flavina-adenina-dinucleotídeo
$FADH_2$	flavina-adenina-dinucleotídeo reduzida
GPx	glutathiona-peroxidase
H	átomo de hidrogênio
H^+	próton ou próton de hidrogênio
H_2	molécula de hidrogênio
H_2O	molécula de água
H_2O_2	peróxido de hidrogênio
NAD^+	nicotinamida-adenina-dinucleotídeo oxidada
NADH	nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzida

$\text{O}=\text{C}-\text{O}$	grupamento carboxil
O_2	molécula de oxigênio
O_2^-	íon superóxido
OH	hidroxila
$\text{OH}^\cdot$	radical hidroxil
Ph	potencial hidrogeniônico
Pi	fosfato inorgânico
PKA	proteína quinase A2
Q	ubiquinona
QH^-	ânion semiquinona
QH_2	ubiquinol
$\text{R}^\cdot$	radical alquil
$\text{RO}^\cdot$	radical alcoxil
$\text{ROO}^\cdot$	radical peroxil
ROOH	hidroperóxido lipídico
SOD	superóxido dismutase

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	03
1. INTRODUÇÃO.....	04
2. REVISÃO DE LITERATURA	05
2.1. A CÉLULA ESPERMÁTICA	05
2.2. METABOLISMO ENERGÉTICO DOS ESPERMATOZOIDES	06
2.2.1. GLICÓLISE.....	07
2.2.2. COMPLEXO PIRUVATO DESIDROGENASE.	08
2.2.3. CICLO DE KREBS	09
2.2.4. CADEIA TRANSPORTADORA DE ELÉTRONS.....	10
2.2.5. FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA.....	11
2.3. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ERO)	12
2.4. AÇÃO DAS ERO NA CÉLULA ESPERMÁTICA.....	13
2.5. PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	15
2.6. AÇÃO DOS ANTIOXIDANTES.....	16
2.7. PIRUVATO DE SÓDIO.....	16
2.8. COENZIMA Q10 (CoQ10)	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19
HIPÓTESE.....	25
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
CAPÍTULO 2	26
ARTIGO: AÇÃO DO PIRUVATO E COENZIMA Q10 NA REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN EQUINO	27
1. INTRODUÇÃO.....	30
2. MATERIAL E MÉTODOS	31
2.1. ASPECTOS ÉTICOS	31
2.2. REAGENTES	32
2.3. ANIMAIS E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	32
2.4. ANÁLISE DE CINÉTICA ESPERMÁTICA	32
2.5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	33
2.6. AVALIAÇÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO	34
2.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
3. RESULTADOS	35
4. DISCUSSÃO	39
REFERÊNCIAS	42

BANDEIRA, R.S. ADIÇÃO DE PIRUVATO E COENZIMA Q10 AO DILUENTE À BASE DE LEITE DESNATADO PARA REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN EQUINO.

RESUMO

O espermatozoide exige um fornecimento constante de energia para a manutenção de suas funções celulares e quando desafiado por processos de criopreservação do sêmen, sofrem danos irreversíveis. Para o desenvolvimento de técnicas que visam o aumento da longevidade espermática, é necessário considerar que mesmo em metabolismo basal, o espermatozoide necessita de substratos para garantir sua motilidade e poder fecundante após a ejaculação. Para atender suas demandas energéticas, estudos recomendam o uso de nutrientes exógenos, como o piruvato de sódio e a coenzima Q10 (CoQ10), substratos fundamentais na bioenergética celular. Visto a importância da refrigeração de sêmen em ganhões e o potencial destas substâncias em melhorar os parâmetros seminais atuando como substrato energético e antioxidante, respectivamente, o presente trabalho tem por objetivo abordar aspectos relacionados ao metabolismo espermático, bem como o papel do piruvato e CoQ10 visando minimizar os efeitos deletérios da refrigeração sobre a qualidade do sêmen equino. Foram adicionadas diferentes concentrações de piruvato de sódio e da CoQ10 ao sêmen de ganhões considerados “good coolers” (GC) e “bad coolers” (BC). Primeiramente, foram estabelecidas as concentrações mais eficazes de piruvato e CoQ10 no diluente de refrigeração BotuSêmen® (Botupharma Botucatu/SP Brasil) para preservar os parâmetros espermáticos na refrigeração a 5° C por até 48 horas. Foi utilizado 1 ejaculado de 25 ganhões das raças Quarto de Milha e Mangalarga Marchador, cada ejaculado foi dividido em 7 frações, sendo uma parte destinada ao grupo controle (CT) e o restante dividido entre o piruvato de sódio e a CoQ10, adicionados nas concentrações de 1 mmol/l (P1), 2 mmol/l (P2), 3 mmol/l de piruvato de sódio (P3), 25 µmol/l (Q25), 50 µmol/l (Q50) e 75 µmol/l de coenzima Q10 (Q75) e submetidos ao processo de refrigeração a 5°C. Na segunda etapa, foram utilizados 2 ejaculados de 7 ganhões considerados BC, bem como as concentrações mais eficazes de piruvato de sódio e CoQ10 e sua associação. Cada ejaculado foi dividido em 4 frações, sendo P1, Q25, associação de P1 + Q25 e o grupo controle (CT - BotuSêmen®). As amostras foram avaliadas quanto à cinética espermática, integridade de membrana plasmática, produção de espécies reativas ao oxigênio (H_2O_2 e O_2^-) e potencial mitocondrial imediatamente após a colheita do sêmen, 24 e 48 horas de armazenamento a 5°C. No primeiro momento, não houve diferença significativa entre os grupos tratados e o controle, para os ganhões GC em nenhum dos tempos analisados. Para os ganhões BC houve diferença significativa no tempo de 48 horas (T48), onde os grupos P1, Q25 e Q75 apresentaram-se superiores ao grupo CT para motilidade total (MT), progressiva (MP) e rápidos (RAP) ($p < 0,05$). Na segunda etapa houve diferença significativa nos grupos tratados, comparados ao controle no T48, apresentando melhores resultados para as avaliações de MT (P1, P1Q25), MP (P1, P1Q25) e RAP (P1, Q25 e P1Q25) ($p < 0,05$). Para a avaliação da concentração de H_2O_2 intracelular houve diferença entre o grupo P1 em relação ao CT. Conclui-se que o piruvato de sódio na concentração de 1 mmol/l, a coenzima Q10 na concentração 25 µmol/l, ou a sua associação adicionados ao diluidor de refrigeração, melhoram as características de cinética espermática em ganhões “bad coolers” após 48 horas de refrigeração a 5°C.

Palavras-Chave: antioxidante, sêmen, criopreservação.

ABSTRACT

The spermatozoa require a constant supply of energy for the maintenance of their cellular functions and when challenged by processes of cryopreservation of the semen, they suffer irreversible damages. For the development of techniques that aim to increase sperm longevity, it is necessary to consider that even in basal metabolism, the spermatozoa require substrate to ensure their motility and fertilizing power after ejaculation. To attend their energy demands, studies recommend the use of exogenous nutrients, such as sodium pyruvate and coenzyme Q10 (CoQ10), key substrates in cellular bioenergetics. Considering the importance of semen cooling in stallions and the potential of these substances to improve seminal parameters acting as an energetic and antioxidant substrate, this review aims to address aspects related to cooling, as well as the role of sodium pyruvate and CoQ10 in minimizing the effects of cooling on the quality of equine semen. Different concentrations of sodium pyruvate and CoQ10 have been added to semen from good coolers (GC) and bad coolers (BC). First, the most effective concentrations of sodium pyruvate and CoQ10 in the BotuSêmen® extender (Botupharma Botucatu / SP Brazil) were established to preserve the sperm parameters at 5°C for up to 48 hours. Each ejaculate was split into 7 treatments, with sodium pyruvate and CoQ10 being added at concentrations of 1 mmol/l (P1), 2 mmol/l (P2), 3 mmol/l sodium pyruvate (P3), 25 µmol/l (Q25), 50 µmol/l (Q50) and 75 µmol/l of coenzyme Q10 (Q75) and subjected to the cooling process at 5°C. In the second step, only stallions considered BC were used, as well as the most effective concentrations of sodium pyruvate and CoQ10 and their association. Each ejaculate was split into 4 treatments, being P1, Q20, association of P1 + Q20 and the control group (CT - BotuSêmen®). The samples were evaluated for sperm kinetics, plasma membrane integrity, reactive oxygen species production (H_2O_2 and O_2^-) and mitochondrial potential immediately after semen collection, 24 and 48 hours of storage at 5°C. At the first moment, there was no significant difference between the treated and control groups for the GC stallions in any of the times analyzed. For the BC stallions, there was a significant difference in the time of 48 hours (T48), where the groups P1, Q25 and Q75 were superior to the CT group for total motility (TM), progressive motility (PM) and rapid (RAP) motile ($p < 0,05$). In the second stage there was a significant difference in the treated groups compared to the control in T48, presenting better results for the evaluations of TM (P1, P1Q25), PM (P1, P1Q25) and RAP (P1, Q25 and P1Q25) ($p < 0,05$). In order to evaluate the intracellular H_2O_2 concentration there was a difference between the P1 group and the CT. In conclusion, sodium pyruvate at the concentration of 1 mmol/l, coenzyme Q10 at 25 µmol/l or its combination added to cooling extender improved the sperm kinetics characteristics in bad coolers stallions after 48 hours of cooling at 5°C.

Key-words: antioxidant, semen, cryopreservation.

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Durante o processo de criopreservação do sêmen dos mamíferos, invariavelmente ocorrem danos (principalmente à estrutura da membrana celular espermática) com extensão variável, de acordo com a composição lipídica das células, característica de cada espécie (WATSON, 2000; MACÍAS GARCÍA et al., 2011). Apesar da otimização dos protocolos utilizados, em geral, de 40-50% dos espermatozoides submetidos ao processo não sobrevivem, visto os efeitos do estresse osmótico, da curva de refrigeração, da susceptibilidade ao choque térmico e composição dos diluentes utilizados sobre estas células (WATSON, 2000).

Para o desenvolvimento de técnicas que visam o aumento da longevidade espermática, é necessário o seu entendimento metabólico. Os espermatozoides são células altamente especializadas que armazenam e transportam o material genético, possuindo as habilidades de motilidade ativa e fertilização do oócito (AURICH, 2005).

O espermatozoide exige um fornecimento constante de energia para a manutenção das funções celulares, necessárias para sua sobrevivência (ALBERTS et al., 2002). Mesmo que a célula espermática necessite pouca energia para manter seu metabolismo basal, uma grande quantidade de substratos é necessária para garantir sua motilidade e poder fecundante após a ejaculação. Para isso, nutrientes exógenos são necessários para atender suas demandas energéticas, os quais serão metabolizados intracelularmente (AMANN e GRAHAM, 2011).

Assim como todas as células vivas em condições aeróbicas, os espermatozoides produzem espécies reativas de oxigênio (ERO) como resultado do metabolismo energético. A maioria das ERO é neutralizada por elementos contidos no plasma seminal, mantendo um equilíbrio entre produção e neutralização. No entanto, quando há excesso de ERO, o espermatozoide é submetido a um estresse oxidativo, podendo ocasionar danos ao DNA e à membrana celular (AURICH et al., 2005).

Assim, diversos estudos têm sido conduzidos no intuito de identificar substâncias com potencial para a crioproteção, minimizando os efeitos das ERO e consequentemente do estresse oxidativo. O piruvato, por exemplo, é conhecido como um excelente substrato energético que pode se mover livremente no citoplasma e mitocôndrias da célula, assim como é considerado um captador de peróxido de hidrogênio, realizando proteção contra danos oxidativos resultantes do metabolismo celular (UPRETI et al., 1997). Outros compostos importantes com ação antioxidante, seja por prevenção ou atenuação do

processo dividem-se entre enzimáticos, que tem sua função antioxidante desempenhada por enzimas, como o superóxido dismutase (SOD), a glutational-peroxidase (GPx), e a catalase (CAT), e os não enzimáticos, que são compostos de baixo peso molecular encontrados no plasma seminal, sendo os de maior relevância na reprodução a vitamina C, α -tocoferol (vitamina E), glutational reduzida e a coenzima Q10 (ANDRADE et al., 2010; YOUSEFIAN et al., 2014).

Visto a importância do transporte de sêmen refrigerado de garanhões e o potencial destas substâncias em melhorar os parâmetros seminais após o armazenamento, a presente revisão tem por objetivo abordar aspectos relacionados à refrigeração de sêmen equino, os mecanismos envolvidos neste processo, bem como o papel do piruvato de sódio e coenzima Q10 visando minimizar os efeitos deletérios da refrigeração e transporte sobre a qualidade do sêmen equino.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A CÉLULA ESPERMÁTICA

O espermatozoide é uma célula eucarionte que possui uma única função: a fertilização de um oócito. Sua estrutura, apesar de aparentemente simples revestida por uma membrana plasmática e dividida em acrossoma, cabeça, peça intermediária e flagelo, possui um mecanismo de funcionamento altamente sofisticado e adaptável para que atinja com êxito a tarefa de fertilização, onde para realizar tal atividade, desenvolve uma série de funções altamente coordenadas a nível celular e molecular (VARNER et al., 2015).

A cabeça do espermatozoide equino tem um formato oval e alongado e é responsável pelo armazenamento do material genético. Possui em seu interior um complexo de cromatina condensada formada por ácido desoxirribonucleico (DNA) enrolado em proteínas, as histonas, preenchendo quase toda a sua totalidade (TOSHIMORI e ITO, 2003; RUIZ-PESINI et al., 2007).

O acrossoma é uma vesícula especializada que ocupa 2/3 da dimensão da cabeça do espermatozoide na espécie equina. É formada a partir de uma membrana de duas camadas que contém acrosina, hialuronidase e enzimas hidrolíticas essenciais para a penetração do oócito pelo espermatozoide (BRITO, 2007).

A cauda ou flagelo é a unidade responsável pela movimentação do espermatozoide e é dividida em duas partes: peça principal e peça terminal. Em sua

porção principal, é constituída por uma bainha fibrosa que envolve nove fibras densas, nove pares de microtúbulos periféricos que estão conectados entre si por dineínas e um par central de microtúbulos. A energia gerada pela adenosina trifosfato (ATP) é quem promove o deslocamento desses microtúbulos através das dineínas, realizando a movimentação da cauda. À medida em que se aproxima de sua porção terminal, a cauda vai perdendo a bainha fibrosa e bainha densa, restando apenas os microtúbulos e dineínas (BRITO, 2007; RUIZ-PESINI et al., 2007; VARNER, 2015).

Por fim, entre a cabeça e a cauda há a peça intermediária, responsável pela produção de energia da célula a partir das bainhas mitocondriais, compostas por unidades produtoras de energia, as mitocôndrias (GADELLA et al., 2001) (Figura 1).

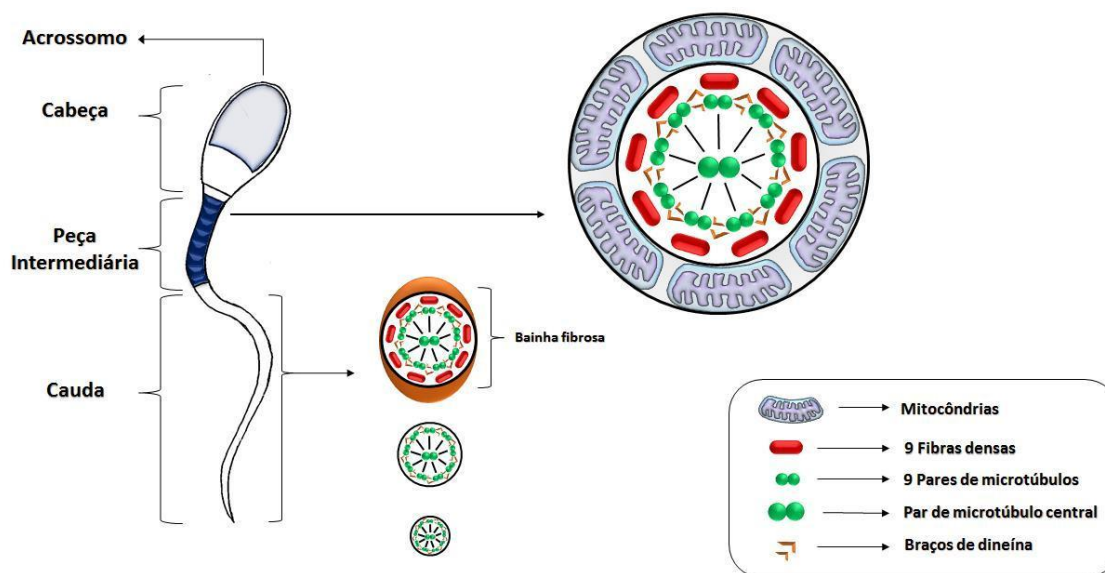


FIGURA 1. Estrutura do espermatozoide (ARAÚJO et al., 2017).

2.2 METABOLISMO ENERGÉTICO DOS ESPERMATOZOIDES

Para que possa desempenhar sua função primordial de transportar o pró-núcleo masculino até o pró-núcleo feminino, a célula espermática necessita de um metabolismo energético que produza quantidade suficiente de energia para completar seu trajeto dentro do útero (SQUIRES et al., 1999). Uma vez que a espécie equina é ineficaz na metabolização da frutose, utiliza-se da glicose como principal fonte energética, produzindo ATP, principalmente através da glicólise e fosforilação oxidativa (VARNER, 2007; JOHNSON, 2007). Por uma série de reações executadas principalmente nas

mitocôndrias, a glicose ($C_6H_{12}O_6$) é convertida a seis moléculas de dióxido de carbono (CO_2), seis moléculas de água (H_2O) e 32 moléculas de ATP (NELSON; COX, 2014).

A produção de energia dentro da mitocôndria se dá através de cinco etapas, sendo glicólise, complexo piruvato-desidrogenase, ciclo do ácido cítrico, cadeia transportadora de elétrons e fosforilação oxidativa, gerando ATP necessário para a manutenção e movimentação das células (NELSON; COX, 2014).

2.2.1 GLICÓLISE

A glicólise consiste em uma série de reações catalisadas por enzimas pelos quais uma molécula de glicose é degradada gerando duas moléculas de piruvato ($C_3H_4O_3$) e com um ganho final de 2 ATP's. É dividida em duas etapas: fase de preparação e fase de pagamento (PELICANO et al., 2006).

Na fase de preparação cada molécula de glicose será convertida a duas moléculas de gliceraldeído-3-fosfato, as quais irão passar pela fase de pagamento. Para que tal reação aconteça, são gastas duas moléculas de ATP (doadores de grupo fosforil) que serão convertidas em duas moléculas de adenosina difosfato (ADP). Já na fase de pagamento, as moléculas provenientes da fase de preparação sofrerão ação das desidrogenases, onde serão removidos dois átomos de hidrogênio (H) na forma de hidrogênio molecular (H_2). Este H_2 sofre uma quebra em sua estrutura e forma um próton de (H^+) que será liberado no meio e outro que será ligado a um par de elétrons, na forma de íon hidreto ($:H^+$) que por sua vez será carregado pela coenzima nicotinamida-adenina-dinucleotídeo oxidada (NAD^+). O NAD^+ tem a função de transportar os elétrons e os H^+ liberados nas reações de desidrogenação, convertendo-se à nicotinamida-adenina-dinucleotídeo reduzida (NADH) e posteriormente se direcionar à cadeia de transporte de elétrons. Neste processo serão produzidas 4 moléculas de ATP, gerando um saldo de duas ATP ao final da glicólise (NELSON; COX, 2014).

Ao término dessas reações, teremos a produção de duas moléculas de NADH e duas de piruvato, sendo uma parte da energia conservada na forma de ATP e em sua maioria armazenada no produto piruvato que seguirá para o complexo piruvato-desidrogenase (Figura 2).

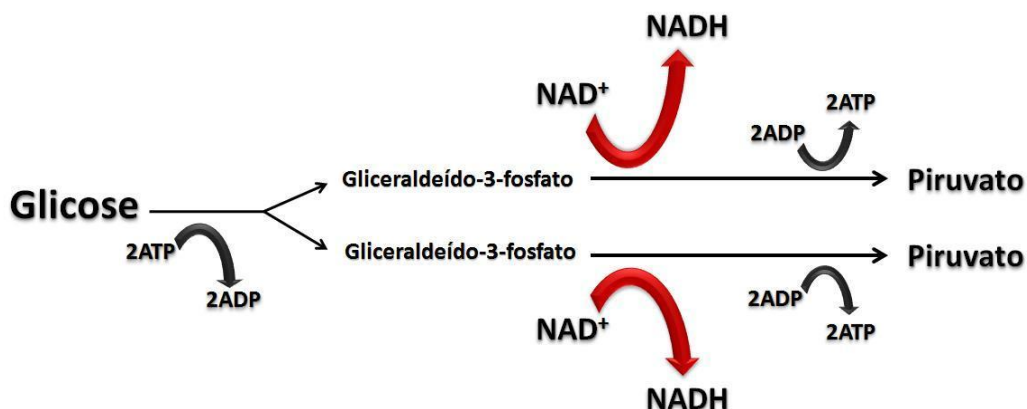


FIGURA 2. Reação de conversão de uma molécula de glicose à duas moléculas de piruvato durante a glicólise. (Autoria: L.F.M.C. SILVA).

2.2.2 COMPLEXO PIRUVATO-DESIDROGENASE

O complexo piruvato-desidrogenase desempenha um papel chave no metabolismo da glicose através de um processo chamado descarboxilação oxidativa, onde duas moléculas de piruvato serão convertidas a duas moléculas de acetil coenzima A (acetil-CoA) após a remoção de um grupamento carboxil ($\text{O}=\text{C}-\text{O}$) na forma de CO_2 , dentro da matriz mitocondrial (PATEL e KOROTCHKINA, 2001). Além das duas moléculas de acetil-CoA e CO_2 , também serão formadas duas moléculas de NADH, a partir de duas moléculas de NAD^+ que transferem dois :H^+ pela reação de desidrogenação (STRUMILO, 2005), e logo passarão para a próxima fase, chamada ciclo de Krebs ou ciclo do ácido cítrico (Figura 3).

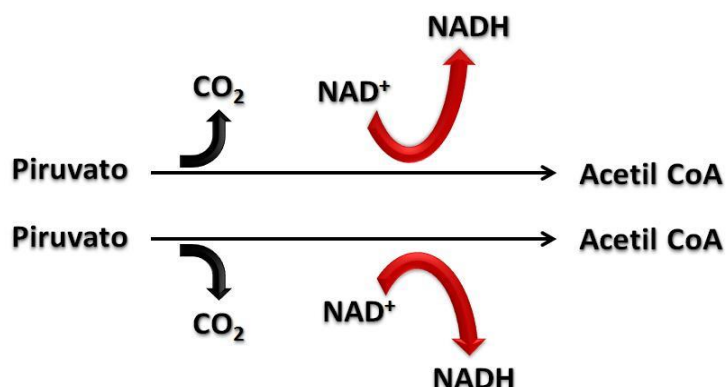


FIGURA 3. Reação do complexo piruvato-desidrogenase. Conversão de duas moléculas de piruvato em duas Acetil CoA, promovendo a formação de dois NADH (Autoria: L.F.M.C. SILVA).

2.2.3 CICLO DE KREBS

O ciclo de Krebs ou ciclo do ácido cítrico é uma via catabólica principal por meio da qual o acetil-CoA é totalmente oxidado a CO_2 , transferindo elétrons e íons H^+ a coenzimas dentro da matriz mitocondrial e assim extraindo todo o seu potencial energético. Para que este processo se realize, cada uma das moléculas de acetil-CoA será transformada em uma molécula de oxaloacetato, liberando a coenzima A, sendo essa reação catalisada pela enzima citrato-sintase e tendo por produto final um complexo de seis carbonos, o citrato, o qual passará por oito reações dentro do ciclo (NELSON; COX, 2014).

Dentre essas reações, ocorrem duas descarboxilações oxidativas que dão origem a duas moléculas de CO_2 e quatro reações de desidrogenação onde os elétrons e íons H^+ serão liberados para as coenzimas NAD^+ e flavina-adenina-dinucleotídeo (FAD), a qual após receber estas cargas, será convertida a flavina-adenina-dinucleotídeo reduzida (FADH_2). Como produto final do ciclo, para cada acetil-CoA serão formadas 1 ATP, 2 moléculas de CO_2 , além de 3 NADH e 1 FADH_2 , as quais seguirão para a fase seguinte do metabolismo energético da célula, a cadeia transportadora de elétrons (BERTRAM et al., 2006; NELSON; COX, 2014) (Figura 4).

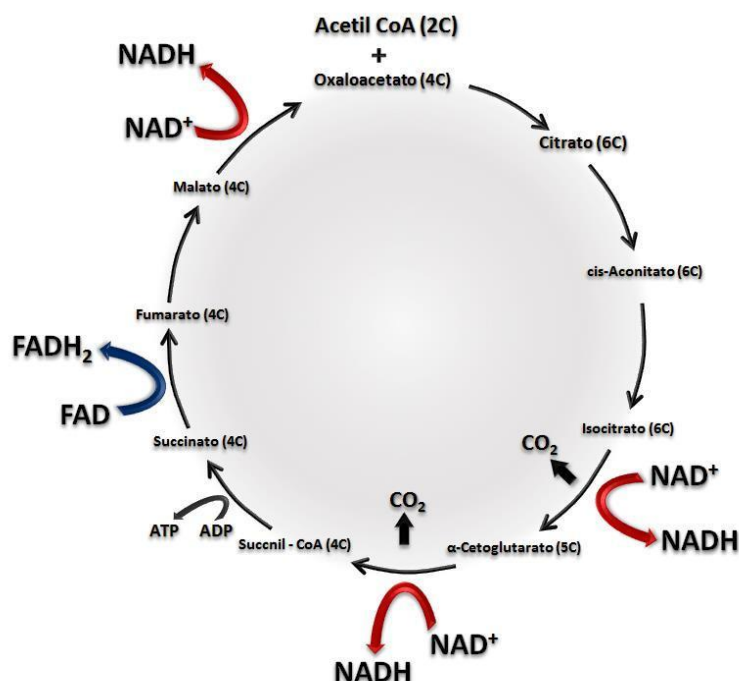


FIGURA 4. Reação do ciclo de Krebs. Formação de três NADH e uma FADH_2 a partir de uma molécula de acetil CoA. (Autoria: L.F.M.C. SILVA).

2.2.4 CADEIA TRANSPORTADORA DE ELÉTRONS

A cadeia transportadora de elétrons ou cadeia respiratória está situada na membrana mitocondrial interna e possui esta nomenclatura por ser a última via pela qual fluem para o oxigênio os elétrons originados de diferentes combustíveis (CHAMPE et al., 2006). A cadeia é composta por 5 complexos, os quais reduzem o oxigênio em H_2O através de reações de oxidação-redução (NELSON; COX, 2014). Durante o processo de metabolização da glicose, a maior parte da energia está na forma de coenzimas reduzidas e não diretamente na forma de ATP (MARZZOCO e TORRES, 1999).

Foram produzidas duas moléculas de NADH durante a glicólise, outras duas a partir das moléculas de piruvato pelo complexo piruvato-desidrogenase e seis pelo metabolismo das duas moléculas de acetil-CoA no ciclo de Krebs, totalizando dez moléculas, além de duas moléculas de $FADH_2$ pelo ciclo do ácido cítrico. Neste momento, os NADH e os $FADH_2$ produzidos anteriormente irão liberar seus H^+ e seus elétrons, com o intuito de produzir ATP.

Cada uma dessas moléculas de NADH e $FADH_2$ é responsável por carrear dois elétrons em sua estrutura, os quais serão transferidos primeiramente para aceptores intermediários e terão como aceitor final o oxigênio (O_2). Além dessa transferência, também haverá a mobilização de H^+ entre a matriz mitocondrial e o espaço intermembranas, o que será posteriormente fundamental na síntese de ATP (VENDITTI et al., 2013).

Dentro da matriz mitocondrial há uma grande quantidade de prótons resultantes das reações de desidrogenação que ocorreram dentro deste compartimento. Estes H^+ não conseguem migrar passivamente pela membrana interna da mitocôndria por serem impermeáveis à maioria dos íons. Sendo assim, existem 5 complexos supramoleculares responsáveis por conduzir os prótons para o espaço intermembrana de forma ativa, ou seja, com gasto de energia (RAJENDER et al., 2010).

Primeiramente as moléculas de NADH e $FADH_2$ oriundas da glicólise e do ciclo de Krebs, doam elétrons para a proteína mitocondrial, denominada complexo I. Estes elétrons irão percorrer toda a crista através dos complexos seguintes, II, III, IV e da coenzima Q (ubiquinona). Ao receber esses elétrons, a coenzima Q será totalmente reduzida à QH_2 (ubiquinol) e em seguida, irá transferi-las ao Cit C (citocromo c) que serão responsáveis pelo transporte dos elétrons até o próximo complexo. Já no complexo IV as moléculas de Cit C irão transferir os elétrons aos aceitor final, o O_2 , que necessitará

de quatro elétrons e quatro H^+ para formar duas moléculas de H_2O e assim finalizando a cadeia transportadora de elétrons (GREEN et al., 2004; FERRAMOSCA; ZARA, 2014).

Durante esse processo, há a formação de um radical instável, o ânion Q^- (semiquinona), que poderá eventualmente transferir esse elétron desemparelhado ao O_2 levando a formação do radical superóxido. A geração de superóxido é não enzimática e, portanto, quanto maior a taxa de metabolismo, maior será a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) (FINKEL; HOLBROOK, 2000).

A cadeia transportadora de elétrons tem papel duplamente importante no metabolismo energético, uma vez que além de utilizar a energia produzida pelas coenzimas reduzidas, também liberam coenzimas oxidadas para que participem novamente nos processos de degradação dos nutrientes. Tal energia poderá ser utilizada para a formação de ATP através da ADP e fosfato inorgânico (P_i) e o restante liberado na forma de calor. Esse processo que ocorre nas cristas da membrana mitocondrial interna é denominado fosforilação oxidativa (MARZZOCO e TORRES, 1999).

2.2.5 FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA

A fosforilação oxidativa é a fase final da produção energética no metabolismo dos organismos aeróbicos. Esta via também pode ser considerada como um complemento da cadeia transportadora de elétrons, uma vez que utiliza o gradiente de prótons formado anteriormente para a produção de ATP (DEVLIN, 1997).

Sendo o NADH uma molécula especializada na doação de elétrons e o oxigênio ávido por recebê-los, a transferência de elétrons ao longo da cadeia transportadora é energeticamente favorecida (CHAMPE et al., 2006). Ao mesmo tempo em que ocorre essa transferência, ocorre um transporte de prótons, responsáveis pela produção das moléculas de ATP, através da membrana mitocondrial interna, da matriz até o espaço intermembranas, criando um gradiente elétrico e um gradiente de potencial hidrogeniônico (pH) na membrana interna (MARZZOCO e TORRES, 1999). Estes prótons adentram à matriz mitocondrial de duas formas distintas, utilizando a fosfato-translocase ou pela ATP-sintase (CAPALDI, 1982).

Sendo a membrana mitocondrial interna impermeável à maioria das substâncias hidrofílicas ou com carga, existem inúmeras proteínas transportadoras que permitem a passagem de substâncias do espaço intermembranas para a matriz mitocondrial

peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que apesar de possuir estabilidade em sua estrutura, é o precursor na formação do radical hidroxil (MAIA; BICUDO, 2009).

Fisiologicamente, em concentrações normais, as ERO são necessárias para o funcionamento celular normal e fundamentais para o processo de capacitação espermática, na reação acrossomal e na interação entre espermatozoide e o oócito (BURNAUGH et al., 2007). Porém, quando em excesso, prejudicam e produzem o estresse oxidativo, consequentemente a diminuição de motilidade e da viabilidade espermática (AITKEN et al., 2014; VARNER et al., 2014).

O O_2^- e o H_2O_2 , em baixas concentrações, são responsáveis por ativar proteínas quinases específicas. Estas enzimas têm a função de catalisar a transferência de grupos fosfato provenientes de moléculas como o ATP, em direção à tirosina, promovendo fosforilação desta proteína (AITKEN et al., 1995; LECLERC et al., 1997; O'FLAHERTY et al., 2006), o que implica na modificação da estrutura e alteração na simetria da membrana, transformações que levam à capacitação, hiperativação e reação acrossomal, condições necessárias para que o espermatozoide penetre a zona pelúcida (DE LAMIRANDE; GAGNON, 1993; AITKEN et al., 1995; LECLERC et al., 1997; VISCONTI; KOPF, 1998; GADELLA et al., 2001; NAZ; RAJESH, 2004).

2.4 AÇÃO DAS ERO NA CÉLULA ESPERMÁTICA

Apesar de baixos níveis de ERO na célula espermática serem necessários para realizar ajustes metabólicos e essenciais para a ocorrência de alguns eventos fisiológicos como a maturação, capacitação, ligação a zona pelúcida e fertilização, o seu excesso resulta em danos a célula, podendo reagir com enzimas, lipídeos da membrana e ácidos nucleicos, tendo a capacidade de danificá-los (BAUMBER et al., 2003; RAJENDER et al., 2010).

Para que o espermatozoide penetre na zona pelúcida do oócito é fundamental que ocorra a sua hiperativação, evento compreendido na capacitação espermática e que ocorre no local da fertilização (HO; SUAREZ, 2001). A reação acrossômica, por sua vez, é um evento de exocitose e têm início após a ligação da célula espermática à glicoproteína três da zona pelúcida (ZP_3) do oócito, onde enzimas hidrolíticas e proteolíticas (principalmente acrosina e hialuronidase) são liberadas para poder penetrar a zona pelúcida e fundir-se ao oócito. A fusão entre a membrana acrossomal externa e a

membrana plasmática na cabeça do espermatozoide ocorre liberando o conteúdo acrossômico (FLORMAN et al., 2008).

Para que ocorra a capacitação, primeiramente é necessário um efluxo de colesterol presente em grande quantidade na membrana espermática e que é responsável pela sua regulação e fluidez. Este efluxo está associado às vias de transdução de sinais e é promovido mediante carreadores de esterol, ocasionando um aumento da fluidez e permeabilidade da membrana para alguns íons, como o cálcio e o bicarbonato, que afetam as moléculas de sinalização. O aumento do bicarbonato intracelular é um evento primordial durante a capacitação e a reação acrossomal, uma vez que é responsável por ativar a adenilato-ciclase (AC) para produzir 3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico (AMPC), ativando a proteína quinase A2 (PKA), para fosforilar, indiretamente, algumas proteínas em resíduos de tirosina (FLESH; GADELLA, 2001).

Apesar do mecanismo de regulação do bicarbonato para a capacitação não estar totalmente elucidado, sua presença na célula tem grande correlação com um aumento intracelular do pH, regulação dos níveis de AMPC e hiperpolarização da membrana plasmática (NISHIGAKI et al., 2014).

Outro evento relacionado à capacitação é a fosforilação de proteínas, principalmente em resíduos de tirosina, agindo sobre modulação iônica e regulação de receptores, sendo que a adição ou remoção de grupos fosfato pode induzir alterações conformacionais, alterando a simetria da membrana, resultando em ativação ou inativação da célula (PAWSON, 2004).

Sendo assim, taxas equilibradas de ERO nas células espermáticas podem promover uma desestruturação fisiológica na membrana plasmática, levando à adesão do espermatozoide à zona pelúcida do oócito (AITKEN et al., 1989). In vitro, também foi observado que o aumento nos níveis de H_2O_2 induziu um aumento dos níveis de cálcio intracelular em espermatozoides de ratos, o que indica uma maior capacidade de fertilização (COHEN et al., 1998).

Liu et al., 2002 relataram que altos níveis de OH circulantes promovem uma desestruturação de enzimas essenciais, como a succinato desidrogenase e enzimas do complexo I, o que compromete a produção de ATP no ciclo de Krebs pela inativação do transporte de elétrons, causando assim uma diminuição na motilidade espermática.

Portanto, o desequilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes causam diversas consequências deletérias à célula espermática, sendo o dano aos lipídeos da membrana,

que ocasionam o processo de peroxidação lipídica, um dos mais significativos (GRIVEAU; LE LANNOU, 1997).

2.5 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Uma sequência de reações em cadeia determina a peroxidação lipídica a partir da ação do radical OH. Primeiramente, há o sequestro de um H^+ dos ácidos graxos poliinsaturados presentes na bicamada fosfolipídica das membranas, os quais são excelentes alvos por possuírem em sua cadeia de carbonos uma ou mais ligações duplas, convertendo-o a H_2O . Nesse processo há uma desestabilização do ácido graxo formando uma região reativa, com um elétron livre, o radical alquil ($R^\bullet$). Esta região, agora instável, acaba reagindo com uma molécula de O_2 circulante formando os radicais alcóxil ($RO^\bullet$) ou peróxil ($ROO^\bullet$), os quais tentam buscar estabilidade com a retirada de uma molécula de H^+ e um elétron presente nos fosfolípidos adjacentes, levando a formação do hidroperóxido lipídico ($ROOH$). A retirada deste H^+ do ácido graxo vizinho, induz a formação de um novo $R^\bullet$, o que resulta em uma reação em cadeia. (GARDNER, 1989; HALLIWELL, 2006). Caso essa reação não seja interrompida, a membrana terá a sua fluidez, elasticidade e permeabilidade afetadas, causando a sua fragilidade e posterior quebra da estrutura, levando a diminuição da motilidade e viabilidade espermática (STOREY, 1997).

O processo de peroxidação lipídica altera a fluidez e a integridade funcional da membrana, o que compromete a capacidade fecundante e a motilidade espermática. Os ácidos graxos insaturados são mais susceptíveis aos danos peroxidativos causados pelas ERO, e o espermatozoide equino é especialmente mais susceptível devido às altas concentrações destes ácidos graxos em sua membrana (AITKEN, 1995).

As consequências do estresse oxidativo são relevantes durante o armazenamento do sêmen refrigerado e os danos são aumentados em situações nas quais se retira a maioria do plasma seminal, pois o mesmo possui substâncias e enzimas antioxidantes e esses elementos controlam a peroxidação lipídica (BALL, 2007) (Figura 6).

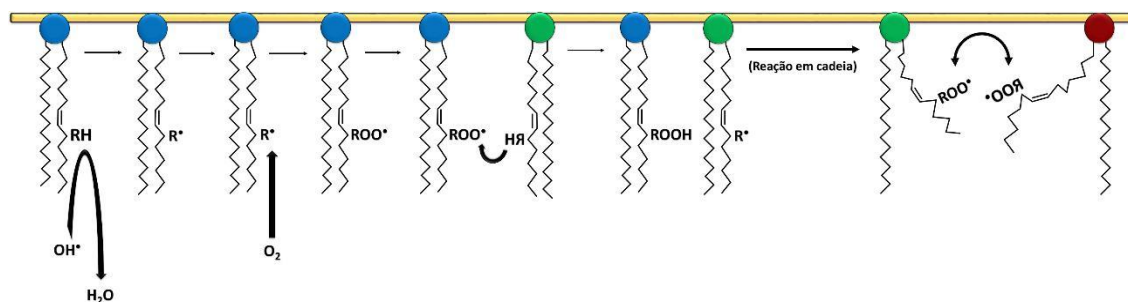


FIGURA 6. Processo de reação em cadeia ocorrido na membrana plasmática durante a peroxidação lipídica. H₂O (água); OH• (radical hidroxil); RH (região estável no ácido graxo); R• (radical alquil); ROO• (radical peroxil); ROOH (hidroperóxido lipídico) (ARAÚJO et al., 2017).

2.6 AÇÃO DOS ANTIOXIDANTES

Nas mitocôndrias, local em que há grande metabolismo oxidativo, parte do oxigênio utilizado na respiração (0,1 a 4%) poderá formar o radical O₂⁻, o que apesar de pequena poderá causar danos às células, fazendo-se necessário que agentes antioxidantes possam neutralizar esses radicais (NELSON; COX, 2014).

As células espermáticas possuem mecanismos e compostos capazes de combater os excessos de ERO produzidos, mantendo assim a homeostase celular. Além disso, substâncias com ação antioxidante, sintéticas ou naturais, são adicionadas aos meios diluidores de sêmen (LENZI et al., 2000).

Os antioxidantes podem ser definidos de duas formas: os enzimáticos, com funções antioxidantes produzidas por enzimas, como a SOD, GPX e CAT e os não-enzimáticos, como o alfa-tocoferol (vitamina E), o ácido ascórbico (vitamina C) e os compostos fenólicos, dentre eles os flavonoides (ANDREYEV et al., 2005; ANDRADE, 2010), atuando de duas maneiras, impedindo a formação dos ERO ou interrompendo a formação em cadeia que ocorre durante a peroxidação lipídica (SILVA; GUERRA, 2012).

2.7 PIRUVATO DE SÓDIO

O piruvato de sódio é um substrato energético, tendo uma ação limitada como antioxidante e preservando a motilidade espermática total em garanhões férteis e subférteis (SILVA, 2008). Apesar de ter sido relatado como removedor de H₂O₂, protegendo os espermatozoides contra danos oxidativos através de uma reação química

direta, não enzimática, em que não ocorre a liberação de O_2 , seu uso como antioxidante é limitado pois há um consumo do piruvato durante esta reação e, portanto, deve ser utilizado concomitantemente com outro antioxidante (UPRETI et al., 1998 e MALLETT et al., 2005).

Ao mesmo tempo, Korkmaz et al. (2017) avaliando sêmen criopreservado de touros da raça Simental, avaliados imediatamente após a descongelação (0hs) e após 3, 6, 12 e 24 h de incubação a 37°C, concluíram que a adição de piruvato de sódio na concentração de 5mmol ao diluente de sêmen promoveu melhora na viabilidade bem como na integridade do DNA dos espermatozoides criopreservados e não afetou sua peroxidação lipídica, embora tenha aumentado a síntese de algumas ERO.

Em espermatozoides de garanhão, na concentração de 2mmol, foi suficiente para proporcionar boa motilidade, porém, em concentrações maiores reduziu a motilidade e velocidade da célula espermática equina (BRUEMMERT et al., 2002). Por outro lado, em altas concentrações, o piruvato agiu como antioxidante em espermatozoides de ovinos (UPRETI et al., 1998) e células somáticas (MAZZIO e SOLIMAN, 2003).

Ao ser utilizado no diluente como substrato energético da célula espermática, possui papel importante para superar o estresse gerado durante os processos de criopreservação e descongelação (FABBROCINI et al., 2000). Avaliando-se o efeito do piruvato de sódio, comparado a vitamina E sobre a qualidade espermática pós-descongelamento, observou-se um incremento na motilidade espermática total em garanhões férteis e subférteis (18,92 e 19,0%, respectivamente), submetidos à congelção (SILVA, 2008).

2.8 COENZIMA Q10 (CoQ10)

A coenzima Q10 (CoQ10) é um composto natural, estruturalmente semelhante a vitamina K e sua nomenclatura química é 2,3-dimetoxi-5-metil-6-decaprenil-1,4-benzoquinona. Atua como uma vitamina no corpo, porém não é considerada como tal, pois ao contrário das vitaminas é sintetizada no organismo. Ela pode ser encontrada em três estados redox: totalmente oxidada (ubiquinona, Q), parcialmente reduzida (semiquinona ou ubsemiquinona, $QH^\cdot$) e totalmente reduzida (ubiquinol, QH_2 ou $CoQH_2$). A CoQ10 é fundamental na bioenergética celular, atuando como cofator no sistema mitocondrial da cadeia transportadora de elétrons, sendo essencial para a produção de ATP (BAHGAVAN; CHOPRA, 2007).

Outros benefícios estão relatados a partir da atuação da CoQ10, como o impedimento da formação de hidroperoxidos, embora hajam descrições de que esta coenzima possa neutralizar esses radicais mesmo após sua formação, e desta forma impedir a lipoperoxidação lipídica. Outra função importante que desempenha é a capacidade de regeneração da vitamina E, apesar de ser observado por alguns autores que este processo seria mais provável através de ascorbato (vitamina C) (TURUNEN et al., 2004).

Diversos estudos utilizando a CoQ10 foram realizados em diferentes espécies animais. Em 2009, Datta e colaboradores utilizaram espermatozoides da cauda do epidídimo de caprinos armazenados *in situ* a -10°C durante 7 e 21 dias utilizando três diluentes contendo lecitina de soja, coenzima Q10 e a associação de ambas, em meios contendo glicerol e livres de eletrólitos, onde verificaram que a associação da lecitina de soja com a CoQ10 foi mais eficaz na proteção dos espermatozoides contra o choque causado pelo frio, bem como teve um maior percentual na motilidade progressiva e integridade da membrana plasmática.

Na espécie equina, foram avaliadas as concentrações de 1 e 2 μmol de CoQ10 tanto isoladas como em associação ao alfa-tocoferol, nas concentrações de 5 e 10 mmol em espermatozoides armazenados a 5°C durante 48 horas. Os resultados mostraram que houve um maior percentual de motilidade progressiva, integridade e funcionalidade da membrana plasmática, assim como menores índices de peroxidação lipídica, quando associadas as concentrações de 1 μmol e 5 mmol de CoQ10 e alfa-tocoferol, respectivamente (YOUSEFIAN et al., 2014).

Em humanos, Nadjarzadeh et al. (2012) avaliaram os efeitos da suplementação de coenzima Q10 sobre as enzimas CAT, SOD e F2-isoprostanos, que serve como biomarcador para peroxidação lipídica em plasma seminal de homens inférteis. Os resultados apontaram para uma maior atividade das enzimas CAT e SOD, bem como uma diminuição do isoprostano no grupo suplementado com CoQ10, além de uma correlação positiva entre as concentrações de CoQ10 e morfologia espermática normal. Deste modo, concluíram que a suplementação com a coenzima Q10 pode diminuir o estresse oxidativo no plasma seminal e promover uma melhoria da atividade das enzimas antioxidantes e das características seminais.

REFERÊNCIAS

AITKEN, R. J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction Fertility and Development**, v.7, n.4, p.659–68, 1995.

AITKEN, R. J.; CLARKSON, J. S.; FISEL, S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. **Biology of Reproduction**, v.40, p.183-97, 1989.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Cell chemistry and biosynthesis. In: **Molecular biology of the cell**, New York: Garland Science, p.47-127, 2002.

AMANN, R. P.; GRAHAM, J. K.; Spermatozoal Function. In: McKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. **Equine Reproduction**, 2 ed. West Sussex: Wiley-Blackwell, cap.102, p.1053-84, 2011.

ANDRADE E. R.; MELO-STERZA F. A.; SENEDA M. M., ALFIERI A. A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, p.79-85, 2010.

ANDREYEV, A. Y.; KUSHNAREVA, Y. E.; STARKOV, A. A. Mitochondrial metabolismo of reactive oxygen species. **Biochemistry**, v.70, p.200-14, 2005.

ARAUJO, E. A. B.; SILVA, L. F. M. C.; OLIVEIRA, S. N.; DALANEZI, F. M.; ANDRADE JR., L. R. P.; SOUZA, F. F.; DELL'AQUA JR., J. A.; PAPA, F. O. Ação das espécies reativas de oxigênio nos espermatozoides. **Veterinária e Zootecnia**, v.24, n.1, p.70-83, 2017.

AURICH C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.89, p.65-75, 2005.

AURICH, C. Recent advances in cooled-semen technology. **Animal Reproduction Science**, v.107, p. 268-75, 2008.

BALL, B. A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. **Animal Reproduction. Science**, V.107, n.3-4, p.257-67, 2008.

BAUMBER, J.; BALL, B. A.; LINFOR, J. J.; MEYERS, S. A. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.24, p.621-28, 2003.

BERTRAM, R.; GRAM P. M.; LUCIANI D. S.; SHERMAN A. A simplified model for mitochondrial ATP production. **Journal of Theoretical Biology**, v.243, p.575-86, 2006.

BRITO, L. F. C. Evaluation of stallion sperm morphology. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v.6, p.249-64, 2007.

BRUEMMER, J. E.; COY, R. C.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Effect of pyruvate on the function of stallion spermatozoa stored for up to 48 hours. **Journal of animal science**, v. 80, n. 1, p. 12-18, 2002.

CAPALDI, R. A. Arrangement of proteins in the mitochondrial inner membrane. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes**, n.3, v.694, p.292-306, 1982.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**, 3 ed. Porto Alegre: Artmed, p.534, 2006.

COHEN, N.; LUBART, R.; RUBINSTEIN, S.; BREITBART, H. Light irradiation of mouse spermatozoa: stimulation of in vitro fertilization and calcium signals. **Photochemistry and Photobiology**, v.68, p.407-13, 1998.

DEVLIN, T. M. **Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations**, 4 ed, New York: John Wiley & Sons, p.827, 1997.

FABBROCINI, A.; DEL SORBO, C.; FASANO, G.; SANSONE, G. Effect of differential addition of glycerol and pyruvate to extender on cryopreservation of mediterranean buffalo (*B. bubalis*) spermatozoa. **Theriogenology**, v.54, n.2, p.193-207, 2000.

FERRAMOSCA, A.; ZARA, V. Bioenergetics of mammalian sperm capacitation. **Biomed Research International**, v.2014, p.1-8, 2014.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v.408, p.239-47, 2000.

FLORMAN, H. M.; JUNGnickel, M. K.; SUTTON, K. A. Regulating the acrosome reaction. **The International Journal of Developmental Biology**, v.52, p.503-10, 2008.

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

GADELLA, B. M.; RATHI, R.; BROUWERS, J. F.; STOUT, T. A.; COLENBRANDER, B. Capacitation and the acrosome reaction in equine sperm. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.249-65, 2001.

GREEN, K.; BRAND, M. D.; MURPHY, M. P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. **Diabetes**, v.53, suppl.1, p.110-18, 2004.

GRIVEAU, J. F.; DUMONT, E.; RENARD, P.; CALLEGARI, J. P.; LELANNOU, D. Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defense systems in human spermatozoa. **Reproduction**, v.103, n.1, p.17-26, 1995.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration. Where are we now? **Journal of Neurochemistry**, v.97, p. 1634-58, 2006.

HO, H. C.; SUAREZ, S. S. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. **Reproduction**, v.122, p.519-26, 2001.

KORKMAZ F, MALAMA E, SIUDA M, LEIDING C, BOLLWEIN H. Effects of sodium pyruvate on viability, synthesis of reactive oxygen species, lipid peroxidation and DNA integrity of cryopreserved bovine sperm. **Animal Reproduction Science**, v.185, p.18-27, 2017.

LENZI, A.; GANDINI, L.; PICARDO, M.; TRAMER, F.; SANDRI, G.; PANFILI, E. Lipoperoxidation damage of spermatozoa polyunsaturated fatty acids (PUFA): scavenger mechanisms and possible scavenger therapies. **Frontiers in Bioscience**, v.5, p.1-15, 2000.

LIU, Y.; FISKUM, G.; SCHUBERT, D. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. **Journal of Neurochemistry**, v.80, p.780-87, 2002.

MACÍAS GARCÍA B.; GONZÁLES, F. L.; ORTEGA F. C.; SALAZAR-SANDOVAL C.; MORILLO R. A.; RODRIGUEZ M. H.; TAPIA J. A.; MORCUENDE D.; PEÑA F. J. Membrane lipids of the stallion spermatozoon in relation to sperm quality and susceptibility to lipid peroxidation. **Reproduction in Domestic Animals**, v.46, p.141-48, 2011.

MAIA, M. S.; BICUDO, S. D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.4, p.183-93, 2009.

MALLET, R. T.; SUN, J.; KNOTT, E. M.; SHARMA, A. B.; OLIVENCIA-YOURVATI, A. H. Metabolic cardioprotection by pyruvate: recent progress. **Experimental Biology and Medicine**, v.230, n.7, p.435-43, 2005.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica Básica**. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, p.360, 1999.

MAZZIO, E.; SOLIMAN, K. F. A. Pyruvic acid cytoprotection against 1-methyl-4-phenylpyridinium, 6-hydroxydopamine and hydrogen peroxide toxicities in vitro. **Neuroscience letters**, v.337, n.2, p.77-80, 2003.

MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. Harper's Illustrated Biochemistry, 25 ed. McGraw-Hill: **Lange Medical Books**, p.692, 2000.

NELSON D. L.; COX M. M. **Princípios da Bioquímica de Lehninger**, 6.ed. Porto Alegre: 29 Artmed; 2014.

NISHIGAKI, T.; JOSÉ, O.; GONZÁLEZ-COTA, A. L.; ROMERO, F.; TREVIÑO, C. L.; DARSZON, A. Intracellular pH in sperm physiology. **Biochemical and Biophysical Research**, v.450, p.1149-58, 2014.

PATEL, M. S.; KOROTCHKINA, L. G. Regulation of mammalian pyruvate dehydrogenase complex by phosphorylation: complexity of multiple phosphorylation sites and kinases. **Experimental and Molecular Medicine**, v.33, p.191-97, 2001.

PAWSON T. Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-sh2 domain interactions to complex cellular systems. **Cell**, v.116, n.2, p.191-203, 2004.

PELICANO, H.; MARTIN, D. S.; XU, R. H.; HUANG, P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. **Oncogene**, v.25, p.4633-46, 2006.

RAJENDER, S.; RAHUL, P.; MAHDI, A. A. Mitochondria, spermatogenesis and male infertility. **Mitochondrion**, v.10, p.419-28, 2010.

RUIZ-PESINI, E.; DÍEZ-SÁNCHEZ, C.; LÓPEZ-PÉREZ, M. J.; ENRÍQUEZ, J. A. The role of the mitochondrion in sperm function: is there a place for oxidative phosphorylation or is this a purely glycolytic process? **Current Topics in Developmental Biology**, v.77, p.3-19, 2007.

SILVA, E. C. B.; GUERRA, M. M. P. Terapias antioxidantes na criopreservação espermática. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.107, p.143-49, 2012.

SILVA, K. M. G.; GAMBOA, S. C.; RODRIGUES, A. S.; SANTOS, J. R.; GUERRA, M. M. P. Adição de piruvato de sódio e trolox ao diluidor utilizado para congelação de sêmen de garanhões férteis e subférteis. **Ciência Rural**, v.38, p.2271-77, 2008.

SQUIRES E. L.; PICKETT B. W.; GRAHAM J. K.; VANDERWALL D. K.; MCCUE P. M.; BRUEMMER J. E. Cooled and Frozen Stallion Semen. **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory**, n.9, p.1-38, 1999.

STOREY, B. T. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v.3, p.203-13, 1997.

STRUMIŁO, S. Short-term regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex. **Acta Biochimica Polonica**, v.52, n.4, p.759-64, 2005.

TOSHIMORI, K.; ITO, C. Formation and organization of the mammalian sperm head. **Archives of histology and cytology**, v.66, n.5, p.383-96, 2003.

TURUNEN, M.; OLSSON, J.; DALLNER, G. Metabolism and function of coenzyme Q. **Biochimica Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v.1660, n.1-2, p.171-99, 2004.

UPRETI, G. C.; JENSEN, K.; MUNDAY, R.; DUGANZICH, D. M.; WISHWANATH, R., SMITH, J. F. Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. **Animal reproduction science**, v.51, n.4, p.275-87, 1998.

UPRETI, G. C.; JENSEN, K.; OLIVER, J. E.; DUGANZICH, D. M.; MUNDAY, R.; SMITH, J. F. Motility of ram spermatozoa during storage in a chemically-defined diluent containing antioxidants. **Animal Reproduction Science**, v.48, p.269-78, 1997.

VARNER, D. D.; GIBB, Z.; AITKEN, R. J. Stallion fertility: a focus on the spermatozoon. **Equine Veterinary Journal**, v.47, p.16-24, 2015.

VARNER, D.; JOHNSON, L. From a Sperm's View – Revisiting Our Perception of This Intriguing Cell. **AEEP Proceedings**, v.53, p.104-77, 2007.

VENDITTI, P.; DI STEFANO, L.; DI MEO, S. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. **Mitochondrion**, v.13, p.71-82, 2013.

WATSON P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved sêmen. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.481-92, 2000.

YOUSEFIAN, I.; ZARE-SHAHNEH, A.; MAHDI ZHANDI, M. The effect of Coenzyme Q10 and α -Tocopherol in skim milk-based extender for preservation of Caspian stallion. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.34, p.949-54, 2014.

HIPÓTESE

A introdução do piruvato atuando como substrato energético e da coenzima Q10 como antioxidante e cofator na produção de ATP ao diluente à base de leite desnatado para refrigeração do sêmen equino, irá propiciar um aporte energético à célula espermática bem como minimizar os possíveis danos causados pelo estresse oxidativo originado pelo processo de criopreservação.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a melhor concentração do piruvato de sódio e/ou da coenzima Q10 no diluente à base de leite desnatado para refrigeração de sêmen equino, capaz de promover manutenção da cinética e viabilidade espermática, durante o processo de criopreservação.
- Aumentar a longevidade espermática após o processo de armazenamento a 5°C em garanhões considerados “good coolers” e “bad coolers”.
- Diminuir os danos espermáticos induzidos pelo estresse oxidativo durante o processo de refrigeração a 5°C por até 48 horas em garanhões considerados “good coolers” e “bad coolers”.

CAPÍTULO 2

Artigo redigido segundo as normas da Journal Equine Veterinary Science, ISSN 0737-0806, ranqueada como B2 pelo QUALIS – CAPES quadriênio 2013 - 2016. <https://www.elsevier.com/journals/journal-of-equine-veterinary-science/0737-0806/guide-for-authors>

AÇÃO DO PIRUVATO E DA COENZIMA Q10 NA REFRIGERAÇÃO DO SÊMEN EQUINO

Rafael S. Bandeira, Mariana L.M. Gobato, Lorenzo G.T. Segabinazzi, Verônica F. C. Scheeren, João A. M. Carneiro, Camila de P. F. Dell'Aqua, Frederico O. Papa, José A. Dell'aqua Júnior

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, Brasil

RESUMO

A refrigeração é a biotécnica que permite a manutenção da viabilidade celular por tempo prolongado através da preservação pelo frio. Apesar da sua relevância, o armazenamento do sêmen criopreservado predispõe a célula espermática à ação das espécies reativas de oxigênio (EROs), o que resulta em danos à membrana plasmática. Outro fator que contribui negativamente durante o armazenamento a frio é a baixa cinética espermática observada em alguns ganhões. A adição de antioxidantes aos diluentes de transporte de sêmen poderia minimizar os efeitos da ação de substratos energéticos metabolizados em etapas distintas na cadeia de produção de ATP e pode se apresentar como uma alternativa para incrementos dos valores de cinética espermática após a refrigeração do sêmen transportado. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da adição de diferentes concentrações do piruvato de sódio e da coenzima Q10 ao diluidor de refrigeração de ganhões considerados “good coolers” (GC) e “bad coolers” (BC), submetidos ao processo de refrigeração. Inicialmente foi realizada uma triagem com 25 animais de duas raças distintas, Quarto de Milha e Mangalarga Marchador, onde foram selecionados 20 animais segundo metodologia adaptada de Hartwig et al., 2013. Destes, 13 ganhões foram considerados GC e 7 ganhões BC para verificação do efeito de diferentes concentrações de piruvato de sódio e coenzima Q10. Cada ejaculado foi dividido em 7 alíquotas e diluído a 50×10^6 espermatozoides por ml entre os diferentes grupos: controle (CT) BotuSêmen®, 1 mmol/l (P1), 2 mmol/l (P2), 3 mmol/l de piruvato de sódio (P3), 25 $\mu\text{mol/l}$ (Q25), 50 $\mu\text{mol/l}$ (Q50) e 75 $\mu\text{mol/l}$ de coenzima Q10 (Q75), todos adicionados ao diluidor controle. Posteriormente, as amostras foram refrigeradas a 5°C por 24 e 48 horas. Em um segundo estudo foram utilizados apenas os ganhões BC e os melhores grupos para cada substância observados na primeira etapa. Nessa fase foram utilizados dois ejaculados de 7 ganhões e cada ejaculado foi dividido em 4 grupos: CT, P1, Q25 e P1Q25 e também refrigerados a 5°C por 24 e 48 horas. As análises espermáticas foram efetuadas em três tempos 0, 24 e 48 horas de refrigeração em relação a cinética espermática pelo sistema CASA, a integridade de membrana plasmática, produção de espécies reativas ao oxigênio (H_2O_2 e O_2^-) e potencial mitocondrial por citometria de fluxo. As análises estatísticas foram efetuadas através do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Tukey quando necessário e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. De acordo com os resultados, não houve

diferença significativa entre os grupos tratados e o controle para os ganhões GC em nenhum dos tempos analisados. Já para os ganhões BC, os grupos P1, Q25 e Q75 apresentaram valores de motilidade total (MT), progressiva (MP) e rápidos (RAP) ($p<0,05$) maiores em relação ao grupo CT após 48 horas de refrigeração. Na segunda etapa houve diferença significativa, novamente após as 48 horas de refrigeração para os grupos com a adição do piruvato (P1 e P1Q25) em relação ao controle para as características de cinética espermática MT, MP e RAP além do grupo suplementado com a coenzima Q10 (Q25), que foi superior ao controle para o parâmetro de motilidade RAP. Para a avaliação da concentração de H_2O_2 intracelular houve diferença entre o grupo P1 em relação ao CT. Conclui-se que o piruvato de sódio na concentração de 1 mmol/l, a coenzima Q10 na concentração 25 μ mol/l, ou a sua associação adicionados ao diluidor de refrigeração, melhoram as características de cinética espermática em ganhões “bad coolers” após 48 horas de refrigeração a 5°C.

Palavras-chave: antioxidante, sêmen, criopreservação, metabolismo espermático.

77 ABSTRACT

78 Cooled-semen is the biotechnology that allows the maintenance of cell viability for a long
79 time through cold preservation. Despite its relevance, the storage of cryopreserved semen
80 predisposes the sperm cell to the action of reactive oxygen species (ROS), which results
81 in damage to the plasma membrane. Another factor that contributes negatively during
82 cold storage is the low sperm kinetics observed in some stallions. The addition of
83 antioxidants to the semen transport extenders could minimize the effect of energy
84 substrates metabolized at distinct stages in the ATP production chain. Also, these
85 components may increase sperm kinetic values after cooled-shipped semen. The objective
86 of this study was to evaluate the effect on addition of different concentrations of sodium
87 pyruvate and coenzyme Q10 to cooling extender for stallions classified as “good”(GC)
88 and “bad coolers”(BC). Firstly, 25 stallions from two distinct breeds Quarter Horse and
89 Mangalarga Marchador were selected and 20 stallions were classified according to
90 Hartwig et al., 2013. Of these 13 stallions were considered GC and 7 BC stallions the
91 used to verify the effect of different concentrations of sodium pyruvate and coenzyme
92 Q10. Each ejaculate was divided into 7 groups and extended to 50×10^6 sperm per mL:
93 BotuSêmen® control (CT), 1 mmol / l (P1); 2 mmol / l (P2); 3mmol / l of sodium pyruvate
94 (P3); 25 μ mol / l (Q25); Q50 μ mol / l (Q50); and 75 μ mol / l of coenzyme Q10 (Q75), all
95 added to the control extender. Subsequently, the samples were cooled at 5°C for up to 48
96 hours. In a second study, only “bad coolers” stallions were used and the best groups for
97 each substance added to extender observed in the first stage. Two ejaculates from seven
98 stallions were used and each ejaculate was split into 4 groups: CT, P1, Q25 and P1Q25
99 and also cooled at 5°C for 24 and 48 hours. The sperm analyzes were performed in three
100 times 0, 24 and 48 hours of cooling. Sperm kinetics was evaluated by a CASA system.
101 Plasma membrane integrity, reactive oxygen species production (H_2O_2 and O_2^-) and
102 mitochondrial membrane potential by flow cytometry. Statistical analyzes were
103 performed using the ANOVA variance test followed by Tukey test when necessary and
104 significance was set at $p < 0.05$. According to the results, there was no significant
105 difference between control and treated groups for GC stallions in any of the times
106 analyzed. For BC stallions, groups P1, Q25 and Q75 presented higher values for total
107 motility (MT), progressive motility (MP) and spermatozoa with rapid movement (R
108 < 0.05) in relation to the CT group after 48 hours of cooling. In the second stage there was
109 a significant difference in sperm kinetics (MT, MP, RAP), again only 48 hours post-
110 cooling for the groups with the addition of pyruvate (P1 and P1Q25) in relation to the
111 control, beyond the group supplemented with coenzyme Q10 (Q25), wich was superior
112 to the control for the RAP motility parameter. In order to evaluate the concentration of
113 intracellular H_2O_2 production, there was a difference between P1 and CT group. In
114 conclusion, sodium pyruvate at the concentration of 1 mmol/l, coenzyme Q10 at 25
115 μ mol/l or its combination added to cooling extender improved the sperm kinetics
116 characteristics in bad coolers stallions after 48 hours of cooling storage at 5°C.

117 Key-words: antioxidant, semen, cryopreservation, sperm metabolism.

118

119 1. INTRODUÇÃO 120

121 A utilização de biotécnicas reprodutivas é uma prática amplamente utilizada na
122 maioria das raças dentro da espécie equina, onde destaca-se a criopreservação do sêmen,
123 seja por refrigeração ou congelamento, como sendo a técnica que permite a manutenção da
124 viabilidade celular por tempo prolongado através da preservação pelo frio [1].

125 Durante o armazenamento do sêmen criopreservado, em razão do metabolismo
126 oxidativo do espermatozoide, são produzidas as espécies reativas de oxigênio (ERO). As
127 ERO são um fator determinante no processo de capacitação espermática, entretanto
128 quando em excesso, predispõe a célula espermática ao estresse oxidativo, onde estas
129 substâncias derivadas do oxigênio reagem com os fosfolipídios da membrana espermática
130 gerando a peroxidação lipídica [2].

131 A peroxidação lipídica altera a fluidez e a integridade funcional da membrana, o
132 que compromete a motilidade espermática e a capacidade fecundante. Esse tipo de lesão
133 acarreta a perda da integridade da membrana e queda na motilidade do espermatozoide
134 [3]. Os ácidos graxos insaturados são mais susceptíveis aos danos peroxidativos causados
135 pelas ERO, e o espermatozoide equino é especialmente mais susceptível devido às altas
136 concentrações destes ácidos graxos em sua membrana quando comparado às outras
137 espécies [4]. As consequências do estresse oxidativo são relevantes durante o
138 armazenamento do sêmen refrigerado, e os danos poderão ser aumentados em situações
139 nas quais se retira a maioria do plasma seminal, pois o mesmo possui substâncias e
140 enzimas antioxidantes e esses elementos controlam a peroxidação lipídica [5].

141 Uma opção para minimizar os danos provocados pelo estresse oxidativo é a adição
142 de antioxidantes e substratos energéticos aos diluentes de sêmen. Estudos têm
143 demonstrado os benefícios na manutenção da integridade de membrana, motilidade e
144 fertilidade ao adicionar, por exemplo, ácido ascórbico e piruvato aos espermatozoides
145 equinos [6,7].

146 O piruvato é um substrato energético, tendo uma ação limitada como antioxidante
147 e preservando a motilidade espermática total em garanhões férteis e subférteis [8]. Apesar
148 de ter sido relatado como removedor de H_2O_2 , protegendo os espermatozoides contra
149 danos oxidativos através de uma reação química direta, não enzimática, em que não
150 ocorre a liberação de O_2 , seu uso como antioxidante é limitado pois há o consumo do
151 piruvato durante esta reação e, portanto, deve ser utilizado concomitantemente com outro
152 antioxidante [9,10]. Ao ser utilizado no diluente como substrato energético da célula

153 espermática, possui papel importante para superar o estresse gerado durante os processos
154 de criopreservação [11].

155 A coenzima Q10 (CoQ10), por sua vez, é um composto natural estruturalmente
156 semelhante a vitamina K e sua nomenclatura química é 2,3-dimetoxi-5-metil-6-
157 decaprenil-1,4-benzoquinona. Atua como uma vitamina no corpo, porém não é
158 considerada como tal, pois ao contrário das vitaminas, é sintetizada no organismo. Ela
159 pode ser encontrada em três estados redox: totalmente oxidada (ubiquinona, Q),
160 parcialmente reduzida (semiquinona ou ubsemiquinona, QH⁻) e totalmente reduzida
161 (ubiquinol, QH₂ ou CoQH₂).

162 A CoQ10 atua como um potente antioxidante em diversos sistemas biológicos,
163 como lipoproteínas e membranas, protegendo contra a oxidação, inibindo a formação de
164 hidroperóxidos, e consequentemente prevenindo a peroxidação lipídica [12].

165 Na célula espermática, a maior concentração de CoQ10 ocorre nas mitocôndrias
166 presentes na peça intermediária, local de intensa produção de energia, o que a torna
167 também, fundamental na bioenergética celular, atuando como cofator no sistema
168 mitocondrial da cadeia transportadora de elétrons, essencial para a produção de ATP [13].

169 O objetivo deste estudo foi determinar o efeito da adição de piruvato e/ou coenzima
170 Q10 na refrigeração do sêmen a 5°C por até 48 horas e suas ações sobre as características
171 espermáticas de garanhões considerados “good coolers” e “bad coolers”.

172

173 2. MATERIAL E MÉTODOS

174

175 2.1 ASPECTOS ÉTICOS

176

177 Os aspectos éticos recomendados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação
178 Animal foram considerados em cada etapa deste estudo, tendo sido aprovado pela
179 Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e
180 Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, sob o protocolo nº 0145/2017.

181

182

183

184 2.2 REAGENTES

185

186 Todos os reagentes utilizados neste estudo foram do mais alto grau de pureza e
187 adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

188

189 2.3 ANIMAIS E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

190

191 Foram utilizados 25 animais, sendo 13 garanhões da raça Quarto de Milha e 12
192 garanhões da raça Mangalarga Marchador com idades entre 5 e 15 anos, clinicamente
193 sadios e com histórico de fertilidade conhecido, os animais eram mantidos em sistema
194 semi-intensivo de criação, com água e suplementação mineral *ad libitum*.

195 A colheita do sêmen foi realizada em dois momentos, utilizando vagina artificial
196 modelo Botucatu (Botupharma, SP, Brasil). Após a colheita do ejaculado, este foi filtrado
197 para retirada a fração gel e a concentração espermática foi determinada com a utilização
198 de câmara de Neubauer. No primeiro momento, cada ejaculado foi fracionado em 7
199 alíquotas e no segundo momento, fracionado em 4 alíquotas e acrescidos os diluentes
200 testados para cada grupo, diluídos para a concentração de 40×10^6 de espermatozoides por
201 ml, respeitando uma diluição mínima de 2:1 (2 partes de diluente para 1 parte de sêmen),
202 não sendo utilizados os ejaculados que não atingiram tal concentração, e então submetidos
203 a refrigeração a 5°C por 24 e 48 horas em sistema passivo de refrigeração (Botuflex,
204 Botupharma, SP, Brasil).

205

206 2.4 ANÁLISE DE CINÉTICA ESPERMÁTICA

207

208 Foram avaliados os parâmetros de cinética espermática pelo sistema
209 computadorizado (CASA - *Computer Assisted Sperm Analysis*, HTM-IVOS 12, Hamilton
210 Thorne Research, Beverly, MA) mensurando 5 campos aleatórios. Para cada amostra foi
211 avaliada a porcentagem de motilidade espermática total (MT), motilidade espermática
212 progressiva (MP) e espermatozoides com movimento rápido (RAP). As configurações do
213 CASA utilizado nesse experimento estão descritas na Tabela 1.

214

215

Tabela 1. Ajuste do HTMA – IVOS – 10 para as realizações das análises seminais em equídeos.

Characteristic	Setup
Image capture (frames per sec)	60 Hz
Image capture (No. of frames)	30
Cell detection (min contrast)	30
Cell detection (min cell size)	30 pixels
Defaults (cellsize)	5 pixels
Defaults (cellintensity)	40
Progressive cells (VAP)	70.0 μ /s
Progressive cells (STR)	80.0%
Slow cells (static: VAP cutoff)	30 μ /s
Slow cells (static: VSL cutoff)	20 μ /s
Illumination: intensity	3,600
Illumination: photometer	125
Video source (dark field)	60 Hz
Static intensity gates (min and max)	0.48 and 1.45
Static elongation gates (min and max)	0 and 97
Chamber type	Makler ¹
Temperature	38° C
Field selection Automatic	

¹Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, USA (chamber depth 10.0 μ m, stage position 14,3mm)

216

217 2.5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

218

219 Para este estudo, foram utilizados apenas os ejaculados que apresentaram
 220 motilidade total imediatamente após a colheita maior ou superior a 60%. Os ganhões
 221 foram classificados em dois grupos, a partir das análises de cinética espermática e
 222 baseando-se no decréscimo percentual de motilidade total entre o tempo da colheita (T0)
 223 e avaliação em 48 horas (T48), no grupo controle, metodologia adaptada de Hartwig et
 224 al., 2013 [14]. Animais que apresentaram decréscimo de 15% ou menos foram
 225 considerados “good coolers” (GC) e os que apresentaram decréscimo de 45% ou mais
 226 foram considerados “bad coolers” (BC). Dos 25 ganhões utilizados inicialmente, 13
 227 foram considerados GC, 7 classificados como BC e 5 permaneceram com parâmetros em
 228 valores intermediários, e não foram utilizados.

229 No primeiro momento, o estudo consistiu em testar e definir quais concentrações
 230 de piruvato de sódio e coenzima Q10 no diluente de refrigeração à base de leite desnatado
 231 seriam mais eficazes para preservar os parâmetros espermáticos a 5°C por 24 e 48 horas.

232 Para tanto, utilizou-se um ejaculado de cada garanhão, processado conforme descrito
233 anteriormente entre os grupos: (CT) BotuSêmen[®], (P1) 1 mmol/l, (P2) 2 mmol/l, (P3) 3
234 mmol/l de piruvato, (Q25) 25 µmol/l, (Q50) 50 µmol/l e (Q75) 75 µmol/l de coenzima
235 Q10. Neste primeiro experimento, apenas foram avaliados os parâmetros de cinética
236 espermática.

237 No segundo momento, foram selecionados os grupos testados com piruvato de
238 sódio e coenzima Q10 que obtiveram melhores parâmetros de cinética espermática em
239 relação ao controle utilizando as menores concentrações, bem como a sua associação.
240 Foram utilizados dois ejaculados de 7 garanhões considerados BC e o experimento
241 consistiu na avaliação dos espermatozoides após o processo de refrigeração do sêmen que
242 foi dividido em quatro grupos: (CT) BotuSêmen[®], (P1) 1 mmol/l de piruvato, (Q25) 25
243 µmol/l de coenzima Q10 e (P1Q25) 1 mmol/l de piruvato associado a 25 µmol/l de
244 coenzima Q10. Para esta etapa foram avaliados os mesmos parâmetros descritos para a
245 primeira etapa, acrescidas as análises de integridade de membrana plasmática (IMP),
246 potencial mitocondrial (PM) e produção de H₂O₂ e O₂⁻ intracitoplasmático.

247

248 **2.6 AVALIAÇÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO**

249

250 Para as análises de citometria de fluxo foi utilizado o equipamento LSR Fortessa
251 (Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) equipado com lasers: azul 488-nm, 100
252 mW, vermelho 640-nm, 40 mW e violeta 405-nm, 100 mW. Após a análise, os dados
253 foram avaliados por programa do mesmo fabricante BD FACSDiva[™] software v6.1.

254 Para todos os ensaios as amostras foram diluídas em TALP-PVA segundo Parrish
255 et al. (1988) modificado (100mmol NaCl, 3,1mmol KCl, 25,0mmol NaHCO₃, 0,3mmol
256 NaH₂PO₄, 21,6mmol DL-lactato de sódio 60%, 2,0mmol CaCl₂, 0,4mmol MgCl₂,
257 10,0mmol Hepes-livre de ácido, 1,0mmol piruvato de sódio, 1,0mg/ml álcool polivinil-
258 PVA e 25µg/ml gentamicina) na concentração de 5x10⁶ espermatozoides/ml, acrescido
259 de Hoescht 33342 (100µg/ml) para eliminação das partículas não celulares.

260 Autofluorescência e controles de cada fluorocromo foram adquiridos para ajuste de
261 sobreposição de onda e compensação utilizando-se a matriz de compensação do próprio
262 software. Os dados foram gerados utilizando-se gráficos dotplot incluindo eixo <0t (bi-
263 exponencial) tornando todos os eventos visíveis e propriamente compensados. No
264 mínimo 10.000 células por amostra foram analisadas.

265 Para a avaliação da produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) intracelular
266 utilizou-se dihidrorhodamine 123 (DHR, D23806 – Life Technologies). Neste ensaio
267 também foi utilizada a associação com de iodeto de propídio, assim em 500µl da solução
268 de sêmen diluído em TALP-PVA foi adicionado 1.5µmol de iodeto de propídio (diluído
269 em TALP-PVA) e 1µmol de DHR (diluído em DMSO), a incubação foi realizada por
270 20min a 37°C ao abrigo da luz.

271 Para avaliação da desestabilização de membrana plasmática, potencial mitocondrial
272 e da geração de superóxido (O_2^-) intracelular foi utilizada a associação Yo-Pro® (YP,
273 Y3603 – Life Technologies; marcação para célula com membrana plasmática lesada),
274 MitoStatusRed (MST; 564697- BD Pharmigen; potencial mitocondrial) e
275 Dihydroethidium (DHE, D23107 – Life Technologies; (geração de ânion superóxido
276 intracitoplasmático). Assim, em 500µl de sêmen diluído em TALP-PVA foi adicionado
277 25nmol de YP, 20µmol de MST e 2µmol de DHE, incubados 20min a 37°C.

278

279 2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

280

281 Os resultados foram avaliados através do programa computacional GraphPad
282 Prisma (GraphPad Software Inc, USA). A normalidade dos dados foi avaliada utilizando
283 o teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Dados paramétricos foram avaliados pela
284 análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey. Para dados não paramétricos
285 foi utilizado Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. Diferenças significativas foram
286 consideradas quando $p < 0,05$.

287

288 3. RESULTADOS

289

290 Em relação aos ganhões GC foi observada diferença significativa apenas no
291 tempo T0 em relação a motilidade progressiva onde os grupos P1 e P2 apresentaram
292 valores superiores ao grupo Q75. Entretanto, após 24 horas de refrigeração não houve
293 diferença estatística entre os grupos. Já as 48 horas, o grupo P1 apresentou MT superior
294 a P3. Em relação a MP, P1 e P2 obtiveram valores maiores aos observados em Q75 e,
295 para espermatozoides rápidos (RAP), P1 superou os grupos P3, Q25, Q50 e Q75 ($p < 0,05$)
296 (tabela 2).

Tabela 2. Médias $\pm$ desvio padrão das características de cinética espermática da ação de diferentes concentrações de piruvato de sódio e da coenzima Q10, nos tempos T0 - pré-refrigeração, T24 – 24 horas e T48 – 48 horas de refrigeração à 5°C para garanhões considerados Good Coolers.

Tempo (h)		CT	P1	P2	P3	Q25	Q50	Q75
T0	MT(%)	75 $\pm$ 12	78 $\pm$ 11	75 $\pm$ 14	74 $\pm$ 16	76 $\pm$ 15	74 $\pm$ 16	72 $\pm$ 16
	MP(%)	33 $\pm$ 13 ^{ab}	40 $\pm$ 11 ^a	40 $\pm$ 12 ^a	38 $\pm$ 12 ^{ab}	37 $\pm$ 12 ^{ab}	34 $\pm$ 11 ^{ab}	31 $\pm$ 12 ^b
	RAP(%)	59 $\pm$ 20	68 $\pm$ 14	66 $\pm$ 16	62 $\pm$ 20	65 $\pm$ 19	62 $\pm$ 17	56 $\pm$ 18
T24	MT(%)	73 $\pm$ 14	75 $\pm$ 14	71 $\pm$ 18	67 $\pm$ 19	75 $\pm$ 15	72 $\pm$ 16	71 $\pm$ 15
	MP(%)	32 $\pm$ 14	38 $\pm$ 13	37 $\pm$ 15	38 $\pm$ 18	37 $\pm$ 15	35 $\pm$ 14	31 $\pm$ 17
	RAP(%)	57 $\pm$ 21	63 $\pm$ 20	58 $\pm$ 20	56 $\pm$ 24	63 $\pm$ 21	60 $\pm$ 19	54 $\pm$ 22
T48	MT(%)	68 $\pm$ 13 ^{ab}	71 $\pm$ 14 ^a	67 $\pm$ 17 ^{ab}	57 $\pm$ 18 ^b	66 $\pm$ 16 ^{ab}	65 $\pm$ 15 ^{ab}	65 $\pm$ 14 ^{ab}
	MP(%)	26 $\pm$ 11 ^{ab}	33 $\pm$ 12 ^a	32 $\pm$ 12 ^a	26 $\pm$ 15 ^{ab}	25 $\pm$ 14 ^{ab}	25 $\pm$ 12 ^{ab}	22 $\pm$ 13 ^b
	RAP(%)	47 $\pm$ 16 ^{ab}	58 $\pm$ 16 ^a	52 $\pm$ 18 ^{ab}	41 $\pm$ 18 ^b	44 $\pm$ 20 ^b	44 $\pm$ 16 ^b	41 $\pm$ 19 ^b

^{ab} Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente entre si ($p < 0,05$)

CT (BotuSemen®); P1 (BotuSemen® + 1 mmol/l de piruvato); P2 (BotuSemen® + 2 mmol/l de piruvato); P3 (BotuSemen® + 3 mmol/l de piruvato); Q25 (BotuSemen® + 25 μ mol/l de CoQ10); Q50 (BotuSemen® + 50 μ mol/l de CoQ10); Q75 (BotuSemen® + 75 μ mol/l de CoQ10). MT: motilidade espermática total; MP: motilidade espermática progressiva; RAP: espermatozoides com movimento rápido

297

298 Para os garanhões considerados BC, não houve diferença nos parâmetros de
 299 cinética espermática no tempo T0 em relação aos grupos controle e tratados, havendo
 300 apenas diferença na análise de MP do grupo P1 em relação ao grupo Q25. No tempo T24,
 301 não houve diferença entre os grupos CT e tratados para todas as análises realizadas. Para
 302 o tempo de 48 horas (T48), os grupos P1, P2, Q25, Q50 e Q75 foram significativamente
 303 maiores que o grupo CT para MT, bem como P1 e Q25 tiveram valores superiores aos do
 304 grupo P3. Para a análise da MP, os grupos P1, Q25 e Q75 foram significativamente
 305 maiores quando comparados ao grupo CT. Finalmente, para a avaliação de RAP, os
 306 grupos P1, Q25 e Q75 foram superiores ao grupo CT, e Q25 apresentou valores superiores
 307 aos do grupo P3 ($p < 0,05$) (tabela 3).

308

309

310

311

312

313

314

Tabela 3. Médias $\pm$ desvio padrão das características de cinética espermática da ação de diferentes concentrações de piruvato de sódio e da coenzima Q10, nos tempos T0 - pré-refrigeração, T24 – 24 horas e T48 – 48 horas de refrigeração à 5°C para garanhões considerados Bad Coolers.

Tempo (h)		CT	P1	P2	P3	Q25	Q50	Q75
T0	MT(%)	77 $\pm$ 9	76 $\pm$ 9	75 $\pm$ 10	72 $\pm$ 11	71 $\pm$ 12	70 $\pm$ 13	70 $\pm$ 12
	MP(%)	32 $\pm$ 9 ^{ab}	39 $\pm$ 10 ^a	37 $\pm$ 12 ^{ab}	35 $\pm$ 11 ^{ab}	28 $\pm$ 14 ^b	30 $\pm$ 15 ^{ab}	29 $\pm$ 13 ^{ab}
	RAP(%)	57 $\pm$ 18	63 $\pm$ 17	60 $\pm$ 19	57 $\pm$ 18	51 $\pm$ 24	53 $\pm$ 22	51 $\pm$ 20
T24	MT(%)	59 $\pm$ 13	63 $\pm$ 17	58 $\pm$ 16	56 $\pm$ 20	63 $\pm$ 16	62 $\pm$ 18	60 $\pm$ 17
	MP(%)	23 $\pm$ 13	30 $\pm$ 14	26 $\pm$ 12	28 $\pm$ 13	27 $\pm$ 15	26 $\pm$ 13	25 $\pm$ 14
	RAP(%)	37 $\pm$ 18	46 $\pm$ 20	38 $\pm$ 19	40 $\pm$ 20	43 $\pm$ 22	44 $\pm$ 22	41 $\pm$ 22
T48	MT(%)	43 $\pm$ 17 ^c	59 $\pm$ 17 ^a	48 $\pm$ 18 ^{ab}	44 $\pm$ 17 ^{bc}	57 $\pm$ 20 ^a	52 $\pm$ 20 ^{ab}	56 $\pm$ 17 ^{ab}
	MP(%)	10 $\pm$ 8 ^b	20 $\pm$ 9 ^a	17 $\pm$ 11 ^{ab}	16 $\pm$ 10 ^{ab}	20 $\pm$ 12 ^a	16 $\pm$ 12 ^{ab}	19 $\pm$ 9 ^a
	RAP(%)	18 $\pm$ 12 ^c	33 $\pm$ 14 ^{ab}	26 $\pm$ 15 ^{abc}	23 $\pm$ 14 ^{bc}	37 $\pm$ 22 ^a	27 $\pm$ 18 ^{abc}	32 $\pm$ 13 ^{ab}

^{ab} Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente entre si ($p < 0,05$)

CT (BotuSemen®); P1 (BotuSemen® + 1 mmol/l de piruvato); P2 (BotuSemen® + 2 mmol/l de piruvato); P3 (BotuSemen® + 3 mmol/l de piruvato); Q25 (BotuSemen® + 25 μ mol/l de CoQ10); Q50 (BotuSemen® + 50 μ mol/l de CoQ10); Q75 (BotuSemen® + 75 μ mol/l de CoQ10). MT: motilidade espermática total; MP: motilidade espermática progressiva; RAP: espermatozoides com movimento rápido

Tabela 4. Médias $\pm$ desvio padrão das características de cinética espermática da ação do piruvato de sódio e da coenzima Q10, e sua associação nos tempos T0 - pré-refrigeração, T24 – 24 horas e T48 – 48 horas de refrigeração à 5°C para garanhões considerados Bad Coolers.

Tempo (h)		CT	P1	Q25	P1Q25
T0	MT(%)	80 $\pm$ 8	81 $\pm$ 8	78 $\pm$ 11	77 $\pm$ 11
	MP(%)	34 $\pm$ 8 ^{ab}	39 $\pm$ 9 ^a	33 $\pm$ 12 ^b	35 $\pm$ 11 ^{ab}
	RAP(%)	67 $\pm$ 16	72 $\pm$ 14	65 $\pm$ 22	64 $\pm$ 21
T24	MT(%)	62 $\pm$ 16	63 $\pm$ 20	65 $\pm$ 18	64 $\pm$ 19
	MP(%)	26 $\pm$ 12	30 $\pm$ 14	30 $\pm$ 14	31 $\pm$ 14
	RAP(%)	45 $\pm$ 20	49 $\pm$ 22	51 $\pm$ 22	50 $\pm$ 22
T48	MT(%)	43 $\pm$ 14 ^b	59 $\pm$ 15 ^a	52 $\pm$ 15 ^a	55 $\pm$ 19 ^a
	MP(%)	15 $\pm$ 9 ^b	25 $\pm$ 11 ^a	23 $\pm$ 11 ^a	25 $\pm$ 13 ^a
	RAP(%)	29 $\pm$ 15 ^b	44 $\pm$ 18 ^a	41 $\pm$ 17 ^a	44 $\pm$ 21 ^a

^{ab} Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente entre si ($p < 0,05$)

CT (BotuSemen®); P1 (BotuSemen® + 1 mmol/l de piruvato); Q25 (BotuSemen® + 25 μ mol/l de CoQ10) e P1Q25 (BotuSemen® + 1 mmol/l de piruvato + 25 μ mol/l de CoQ10). MT: motilidade espermática total; MP: motilidade espermática progressiva; RAP: espermatozoides com movimento rápido

Após triagem inicial com diferentes concentrações de piruvato de sódio e coenzima Q10, optou-se pela padronização das concentrações de 1 $\mu\text{mol/l}$ de piruvato de sódio (P1) e 25 $\mu\text{mol/l}$ de coenzima Q10 (Q25), bem como sua associação (P1Q25) para maiores investigações em relação aos ganhões “bad coolers”. Inicialmente, houve diferença apenas no tempo T0 em relação a MP, sendo os valores de P1 maiores que os de Q25. Já às 48 horas de refrigeração, os grupos com adição de piruvato de sódio (P1 e P1Q25), além do grupo suplementado apenas com a coenzima Q10 (Q25) apresentaram maiores valores de MT, MP e RAP em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) (tabela 4).

Para a avaliação de integridade de membrana plasmática (IMP), produção de O_2^- intracelular e potencial mitocondrial, não houve diferença estatística para nenhum dos grupos em nenhum dos tempos avaliados. Entretanto, a concentração de H_2O_2 intracelular grupo P1 apresentou valores superiores aos observados no grupo controle no tempo T48 ($p < 0,05$). (tabela 5).

328

Tabela 5. Médias $\pm$ desvio padrão da integridade de membrana plasmática, produção de H_2O_2 e O_2^- intracelular e potencial mitocondrial, da ação do piruvato de sódio e da coenzima Q10, e sua associação nos tempos T0 - pré-refrigeração, T24 – 24 horas e T48 – 48 horas de refrigeração à 5°C para ganhões considerados Bad Coolers.

Tempo (h)		CT	P1	Q25	P1Q25
T0	IMP(%)	80 $\pm$ 6	81 $\pm$ 7	82 $\pm$ 7	80 $\pm$ 6
	H_2O_2 (UA)	10241 $\pm$ 638	9740 $\pm$ 522	9680 $\pm$ 640	10683 $\pm$ 633
	O_2^- (UA)	3981 $\pm$ 407	4161 $\pm$ 334	4041 $\pm$ 354	3723 $\pm$ 303
	PM(UA)	3183 $\pm$ 219	3659 $\pm$ 251	3524 $\pm$ 217	3498 $\pm$ 205
T24	IMP(%)	69 $\pm$ 17	68 $\pm$ 19	70 $\pm$ 17	71 $\pm$ 16
	H_2O_2 (UA)	10139 $\pm$ 418	9990 $\pm$ 416	9820 $\pm$ 399	9717 $\pm$ 476
	O_2^- (UA)	3124 $\pm$ 250	3270 $\pm$ 268	3482 $\pm$ 288	3554 $\pm$ 328
	PM(UA)	2103 $\pm$ 206	2225 $\pm$ 185	3150 $\pm$ 318	3237 $\pm$ 278
T48	IMP(%)	69 $\pm$ 17	66 $\pm$ 19	67 $\pm$ 17	66 $\pm$ 21
	H_2O_2 (UA)	10073 $\pm$ 518 ^b	11839 $\pm$ 432 ^a	11281 $\pm$ 558 ^{ab}	10817 $\pm$ 521 ^{ab}
	O_2^- (UA)	3726 $\pm$ 370	3785 $\pm$ 377	3787 $\pm$ 372	4399 $\pm$ 493
	PM(UA)	1995 $\pm$ 188	2051 $\pm$ 213	2177 $\pm$ 211	1990 $\pm$ 182

^{ab} Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente entre si ($p < 0,05$)

CT (BotuSemen®); P1 (BotuSemen® + 1 mmol/l de piruvato); Q25 (BotuSemen® + 25 $\mu\text{mol/l}$ de CoQ10) e P1Q25 (BotuSemen® + 1 mmol/l de piruvato + 25 $\mu\text{mol/l}$ de CoQ10).

IMP: integridade da membrana plasmática; H_2O_2 : concentração total de H_2O_2 ; O_2^- : concentração total de O_2^- ; PM: potencial mitocondrial total; UA: unidade arbitrária.

329 4. DISCUSSÃO 330

331 Neste estudo, o piruvato de sódio e a coenzima Q10 foram adicionados ao diluente
332 à base de leite desnatado para refrigeração de sêmen equino com o intuito de fornecer
333 substrato para a produção de ATP e para atuar como antioxidante, diminuindo os danos
334 causados pelo estresse oxidativo, resultante da elevação nos níveis de ERO provenientes
335 do metabolismo celular após o processo de armazenamento a 5°C durante 24 e 48 horas.
336 Além disso, a utilização de tais substâncias visou verificar sua ação em ganhões
337 considerados “good coolers” e “bad coolers”.

338 Os resultados das análises realizadas no primeiro momento sugerem que ganhões
339 considerados GC possuam capacidade intrínseca de manter os níveis de substrato
340 energético por um longo tempo de armazenamento, o que pode ser observado quando
341 comparados os valores de cinética espermática entre o controle e os grupos tratados após
342 24 (T24) e 48 (T48) horas.

343 Entretanto, os valores das variáveis de cinética espermática avaliados tanto no T0
344 quanto no T48 para P1 em relação ao controle mostraram um efeito biológico positivo da
345 ação do piruvato de sódio, sugerindo que mais estudos com um maior número de animais
346 devem ser efetuados para validação estatística desse possível benefício para ganhões
347 com boa qualidade espermática.

348 Estes resultados geram a expectativa que mesmo ganhões autossuficientes em
349 produção energética através da via convencional pela metabolização da glicose
350 aumentariam sua produção de ATP com o auxílio de um substrato atuando diretamente
351 no ciclo de Krebs, resultando em melhorias nas funções de deslocamento espermático.
352 No entanto, este aumento da atividade mitocondrial e produção de ATP poderia levar a
353 uma superprodução de ERO e consequentemente a um aumento do estresse oxidativo,
354 gerando um desafio maior à capacidade antioxidante intrínseca desses animais em
355 combater essa reação e não acarretar uma diminuição da motilidade e viabilidade
356 espermática [15,16].

357 Tal capacidade de suprimento energético via glicólise não foi observada nos
358 animais classificados como BC, uma vez que estes ganhões foram beneficiados pela
359 adição do piruvato de sódio e CoQ10 para manter seus parâmetros de MT, MP e RAP,
360 havendo diferenças significativas quando comparados ao controle no tempo decorrido de
361 48 horas (T48), reforçando o entendimento de que ganhões BC não apenas apresentam
362 deficiências na capacidade intrínseca de combater a ação dos EROs, mas também na

363 produção de ATP suficiente para manutenção de adequados padrões de cinética
364 espermática, mesmo em momentos iniciais pós ejaculação. Essa hipótese tem como base
365 o fato de que esse grupo de garanhões apresentaria uma deficiência na enzima
366 desidrogenase, tornando ineficiente o processo da glicólise e posterior formação de ATP,
367 explicando o fato da melhora nos parâmetros de cinética quando introduzido o piruvato
368 de sódio, sem a necessidade da sua conversão a partir da glicose.

369 O piruvato tem a capacidade de influenciar diretamente a produção de ATP através
370 da sua entrada no ciclo de Krebs e posterior fosforilação oxidativa que, por sua vez, é a
371 principal via energética da célula [6], já a coenzima Q10 é conhecida como único lipídeo
372 endogenamente sintetizado que apresenta função redox, um agente lipossolúvel promotor
373 de energia, cuja principal função é o transporte de elétrons e prótons levando à síntese de
374 adenosina trifosfato (ATP) na membrana mitocondrial interna, pela cadeia de transporte
375 de elétrons, sendo encontrada em todas as membranas celulares de mamíferos [17,18]. Os
376 resultados encontrados nesse estudo concordam com achados de outros trabalhos, onde
377 houve um incremento nos parâmetros de motilidade após a utilização do piruvato de sódio
378 ou a coenzima Q10 em garanhões [7,8,19], touros [20,21] e carneiros [9].

379 No segundo momento, assim como no primeiro, as amostras dos garanhões
380 considerados BC suplementadas com piruvato de sódio, coenzima Q10 ou sua associação
381 (P1, Q25 e P1Q25) apresentaram valores de MT, MP e RAP significativamente superiores
382 aos do grupo controle, sugerindo que as duas substâncias têm a capacidade de suprir as
383 demandas do metabolismo energético neste grupo de garanhões. Tal fato poderia ser
384 explicado, além da atuação do piruvato de sódio, pela importante atuação da CoQ10 na
385 cadeia transportadora de elétrons, com papel fundamental no transporte de prótons e
386 elétrons na matriz mitocondrial, essenciais na geração de ATP [18], uma vez que a
387 cinética espermática requer alta demanda energética, reforçando a ideia de que a
388 coenzima Q10, mesmo quando utilizada individualmente, contribui para a manutenção
389 da motilidade espermática.

390 Outra possibilidade para o aumento nos parâmetros de motilidade, segundo estudo
391 realizado por Yousefian et al. [19] em equinos, estaria baseado no aumento da eficiência
392 metabólica da coenzima Q10, acarretando em um acréscimo na fosforilação oxidativa
393 fazendo com que o espermatozoide, dependente desta fosforilação para a produção de
394 ATP, fosse beneficiado com o aumento da motilidade espermática. Da mesma forma, em
395 humanos, estudo com sêmen de homens normozoospermicos, oligozoospermicos [22] e
396 astenozoospermicos [17], demonstraram que a incubação com coenzima Q10 preservou

397 a motilidade total e progressiva devido ao incremento da fosforilação oxidativa via
398 eficiência metabólica proporcionada pela coenzima Q10, resultado semelhante também
399 ao encontrado por Gualtieri et al. [21], quando aplicado ao sêmen de touros.

400 Trabalhos realizados com equinos [15,23] e bovinos [21], demonstraram que a
401 CoQ10 além de beneficiar a motilidade dos espermatozoides, foi eficiente na manutenção
402 da integridade das células espermáticas no tempo transcorrido de 48 horas, sugerindo que
403 os resultados pela capacidade da coenzima em doar elétrons ao radical peroxil lipídico da
404 membrana plasmática, interrompendo a reação em cadeia da peroxidação lipídica. Tais
405 estudos corroboram com Carneiro et al. [24], que utilizou a CoQ10 em diluente para
406 centrifugação e congelação de sêmen equino, onde após permanecer a célula na
407 temperatura de 37°C durante 30 minutos, com o objetivo de exacerbar os efeitos causados
408 pela peroxidação lipídica, obteve melhores índices de integridade de membrana em todos
409 os grupos testados quando comparados ao grupo controle.

410 No que se refere a integridade de membrana plasmática, sabe-se que as células
411 espermáticas de garanhões possuem uma grande quantidade de ácidos graxos
412 polinsaturados (PUFAs), o que lhes confere a capacidade de fluidez da membrana e
413 capacidade de resistência à redução na temperatura [25]. Por outro lado, devido à sua
414 estrutura molecular, estes PUFAs atuam como grandes fornecedores de H^+ para os
415 radicais livres, que por sua vez serão responsáveis pela reação em cadeia da peroxidação
416 lipídica na célula [26]. Neste estudo não foram encontradas diferenças significativas para
417 os grupos tratados em relação ao controle, em nenhum dos tempos avaliados, para as
418 análises de integridade de membrana plasmática e potencial mitocondrial, o que
419 possivelmente tenha ocorrido pela metodologia utilizada, uma vez que as células não
420 foram desafiadas à temperatura de 37°C, o que poderia ter demonstrado uma
421 superioridade em preservar a integridade de membrana e manutenção da atividade
422 mitocondrial das células tratadas com a CoQ10 em relação ao grupo controle, como
423 encontrado em estudo realizado por Carneiro et al. [24].

424 Os radicais livres, que são intermediários químicos reativos que possuem um ou
425 mais elétrons desemparelhados em sua estrutura molecular, ao reagirem com moléculas
426 de oxigênio, são chamados de espécies reativas de oxigênio (ERO), sendo os principais:
427 o radical superóxido (O_2^-), o radical hidroxil (OH^-) e o não radical peróxido de hidrogênio
428 (H_2O_2), que apesar de possuir estabilidade em sua estrutura, é o precursor na formação
429 do OH^- [27]. Altas concentrações de H_2O_2 são encontradas em garanhões com alta
430 qualidade seminal, tendo este radical uma correlação positiva com o metabolismo

431 espermático [28]. Os resultados deste estudo em relação a formação de H_2O_2 demonstram
432 que no grupo P1 houve valor significativamente superior quando comparado ao grupo
433 CT, o que nos indica que o H_2O_2 seja o subproduto de uma maior atividade mitocondrial,
434 se apresentando com um substrato alternativo importante para produção de ATP em
435 ganhões BC. Na análise da concentração do O_2^- , não houve diferença significativa entre
436 os grupos estudados, o que pode ser explicado pelo fato de que a CoQ10 não atua
437 diretamente nas espécies reativas, e sim, na fase de iniciação da propagação da
438 peroxidação lipídica, neutralizando os radicais lipídicos após a sua formação.

439 Desta forma, conclui-se que a adição de piruvato de sódio na concentração de
440 1mmol/l, a coenzima Q10 na concentração de 25 μ mol/l ou a sua associação ao diluidor
441 de sêmen, contribuíram para um aumento da atividade mitocondrial na produção de ATP,
442 promovendo uma maior quantidade de espermatozoides com motilidade total, progressiva
443 e de células rápidas, após 48 horas de armazenamento a 5°C em ganhões considerados
444 “bad coolers” quando comparados ao grupo controle.

445

446

447 REFERÊNCIAS

448

449 [1] Nouri H, Towhidi A, Zhandi M, Sadeghi R. The effects of centrifuged egg yolk used
450 with INRA plus soybean lecithin extender on semen quality to freeze miniature caspian
451 horse semen. Journal of Equine Veterinary Science. 2013; 33: 1050-53.

452

453 [2] Burnaugh L, Sabeur K, Ball B A. Generation of superoxide anion by equine
454 spermatozoa as detected by dihydroethidium. Theriogenology. 2007; 67: 580- 89.

455

456 [3] Aitken R J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. Reproduction,
457 Fertility and Development. 1995; 7: 659–68.

458

459 [4] Griveau J F, Dumont E, Renard P, Callegari J P, Lelannou D. Reactive oxygen species,
460 lipid peroxidation and enzymatic defense systems in human spermatozoa. Journal of
461 Reproduction and Fertility. 1995; 103: 17-26.

462

- 463 [5] Ball B A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function
464 and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science*. 2008; 107: 257-67.
465
- 466 [6] Webb G W, Arns M J. Effect of piruvate and lactate on motility of cold stored stallion
467 spermatozoa challenged by hydrogen peroxide. *Journal of Equine Veterinary Science*.
468 2006; 26: 441–44.
469
- 470 [7] Bruemmer J E, Coy R C, Squires E L, Graham J K. Effect of pyruvate on the function
471 of stallion spermatozoa stored for up to 48 hours. *Journal of Animal Science*. 2002; 80:
472 12-18.
473
- 474 [8] Silva K M G, Gamboa S C, Rodrigues A S, Santos J R, Guerra M M P. Adição de
475 piruvato de sódio e trolox ao diluidor utilizado para congelação de sêmen de garanhões
476 férteis e subférteis. *Ciência Rural*. 2008; 38: 2271-77.
477
- 478 [9] Upreti G C., et al. Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram
479 spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. *Animal Reproduction Science*. 1998; 51:
480 275-87.
481
- 482 [10] Mallet R T, Sun J, Knott E M, Sharma A. B, Olivencia-Yurvati A H. Metabolic
483 cardioprotection by pyruvate: Recent Progress. *Experimental Biology and Medicine*
484 (Maywood). 2005; 230: 435-43
485
- 486 [11] Fabroccini A, Del Sorbo C, Fasano G, Sansone G. Effect of differential addition of
487 glycerol and pyruvate to extender on cryopreservavtion of mediterranean buffalo (*B.*
488 *bubalis*) spermatozoa. *Theriogenology*. 2000; 54: 193-207.
489
- 490 [12] Bentinger M, Brismar K, Dallner G. The antioxidant role of coenzyme Q10.
491 *Mitochondrion*. 2007; 7: S41-50.
492
- 493 [13] Bhagavan H N, Chopra R K. Plasma coenzyme Q10 response to oral ingestion of
494 coenzyme Q10 formulations. *Mithocondrion*. 2007; 7: S78-88.
495

- 496 [14] Hartwig F P, Lisboa F P, Monteiro G A, Maziero R R D, Freitas-Dell'Aqua C P,
 497 Alvarenga M A, Papa F O, Dell'Aqua Jr J A. Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: An
 498 alternative for bad cooler stallions. *Theriogenology*. 2013; 81(2): 340-46.
 499
- 500 [15] Aitken R J, Lambourne S, Gibb Z. The John Hughes Memorial Lecture: Aspects of
 501 Sperm Physiologyd Oxidative Stress and the Functionality of Stallion Spermatozoa.
 502 *Journal of Equine Veterinary Science*. 2014; 34: 17-27
 503
- 504 [16] Varner D D, Gibb Z, Aitken R J. Stallion fertility: a focus on the spermatozoon.
 505 *Equine Veterinary Journal*. 2014; 47: 16-24.
 506
- 507 [17] Lewin A, Lavon H. The effect of coenzyme Q10 on sperm motility and function.
 508 *Molecular Aspects of Medicine*. 1997; 18: 213-19.
 509
- 510 [18] Carocho M, Ferreira I C F R. A review on antioxidants, prooxidants and related
 511 controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and
 512 future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*. 2013; 51: 15-25.
 513
- 514 [19] Yousefian I, Zare-Shahneh A, Mahdi Zhandi M. The effect of Coennzyme Q10 and
 515 α - Tocopherol in skim milk-based extender for preservation of Caspian stallion. *Journal*
 516 *of Equine Veterinary Science*. 2014; 34: 949-54.
 517
- 518 [20] Korkmaz F, Malama E, Siuda M, Leiding C, Bollwein H. Effects of sodium pyruvate
 519 on viability, synthesis of reactive oxygen species, lipid peroxidation and DNA integrity
 520 of cryopreserved bovine sperm. *Animal Reproduction Science*. 2017; 185: 18-27.
 521
- 522 [21] Gualtieri R, Barbato V, Fiorentino I, Braun S, Rizos D, Longobardi S, Talevi R.
 523 Treatment with zinc, d-aspartate, and coenzyme Q10 protects bull sperm against damage
 524 and improves their ability to support embryo development. *Theriogenology*. 2014; 82:
 525 592-98.
 526
- 527 [22] Talevi R, Barbato V, Fiorentino I, Braun S, Longobardi S, Gualtieri R. Protective
 528 effects of in vitro treatment with zinc, d-aspartate and coenzyme Q10 on human sperm

529 motility, lipid peroxidation and DNA fragmentation. *Reproduction Biology and*
530 *Endocrinology*. 2013; 11: 1-10.

531

532 [23] Nogueira BG, Zúccari CESN. Coenzima Q10 e α -Tocoferol previnem a
533 lipoperoxidação do sêmen equino refrigerado. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de
534 Medicina Veterinária e Zootecnia da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do
535 Sul, Mato Grosso do Sul. 2015; 57 pág.

536

537 [24] Carneiro J A, et al. Effects of coenzyme Q10 on semen cryopreservation of stallions
538 classified as having good or bad semen freezing ability. *Animal Reproduction Science*.
539 2018; 192: 107-18.

540

541 [25] Aurich C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion
542 spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 2005; 89: 65-75.

543

544 [26] Kothari S, Thompson A, Agarwal A, Plesses S S. Free radicals: Their beneficial and
545 detrimental effects on sperm functions. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2010;
546 48: 425-35.

547

548 [27] Maia M S, Bicudo S D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em
549 mamíferos: uma revisão. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2009; 33: 183-93.

550

551 [28] Gibb Z, Lambourne S R, Aitken R J. The paradoxical relationship between stallion
552 fertility and oxidative stress. *Biology of Reproduction*. 2014; 91: 1-10.