

GIULIA KIYOMI VECHIATO KAWAI

**Efeito da carnosina na prevenção de crioinjúrias no sêmen de garanhões
bons e maus congeladores**

São Paulo

2017

GIULIA KIYOMI VECHIATO KAWAI

**Efeito da carnosina na prevenção de crioinjúrias no sêmen de garanhões
bons e maus congeladores**

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

Departamento:
Reprodução Animal

Área de concentração:
Reprodução Animal

Orientador:
Prof. Dr. Marcilio Nichi

De acordo: _____
Orientador

São Paulo
2017

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3473
FMVZ

Kawai, Giulia Kiyomi Vechiato
Efeito da carnosina na prevenção de crioinjúrias no sêmen de garanhões bons e maus congeladores / Giulia Kiyomi Vechiato Kawai. -- 2017.
89 f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcilio Nichi.

1. Criopreservação espermática. 2. Sêmen equino. 3. Carnosina. 4. Espécies reativas de oxigênio. 5. Malondialdeído. I. Título.



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

Título da proposta: "Efeito da carnosina na prevenção de crío-injúrias no sêmen de garanhões bons e maus congeladores."

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ/USP

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Notificação (versão de 03/janeiro/2017) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Esta emenda é para modificar o n amostral, idade e peso dos animais, a linhagem dos animais, o Resumo do projeto, a Justificativa e a Justificativa do uso e da espécie. As alterações são necessárias pois serão realizadas mudanças no projeto segundo sugestões da banca avaliadora do exame de Qualificação. n amostral: 7 animais Machos Idade: entre 3 e 8 anos Peso: entre 350 a 500Kg Linhagem dos Animais: Mangalarga Paulista Justificativa: O sêmen de alguns garanhões é reconhecidamente mais sensível ao processo de criopreservação. Tal fato pode estar relacionado à seleção para aptidão esportiva e remoção do plasma seminal, passo fundamental para o sucesso da criopreservação do sêmen para utilização na inseminação artificial. Com a retirada do plasma seminal, importantes antioxidantes seriam removidos. Neste contexto, a terapia com o antioxidante carnosina, dipeptídeo com função antienvhecimento, pode ser uma alternativa para a melhora na qualidade do sêmen pós-descongelamento, o que possibilitaria incrementar a utilização a campo da inseminação artificial. Justificativa do uso e da espécie: Será utilizado o sêmen de garanhões da espécie equina, pois é possível refrigerar e criopreservar; porém esse processo pode diminuir a viabilidade celular e a capacidade de fertilização, principalmente em animais com espermatozoides menos resistentes a estes processos. "

Comentário da CEUA: "".

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

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

Roseli da Costa Gomes

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: KAWAI, Giulia Kiyomi Vechiato

Título: Efeito da carnosina na prevenção de crioinjúrias no sêmen de garanhões bons e maus congeladores.

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação,

Aos meus pais e melhores amigos Hirochi Kawai e Selma Kawai que sempre apoiaram e incentivaram todas as minhas escolhas, que sempre lutaram muito, passando por muitas dificuldades para me dar toda base necessária para atingir meus objetivos. Principalmente, me ensinaram a ter caráter, humildade, honestidade e sempre ajudar o próximo.

Aos meus queridos e amados avós Nelson Vechiato (*in memoriam*) e Calina Vechiato que sempre me mimaram muito e participaram ativamente da minha formação pessoal e profissional.

Ao meu irmão, que mesmo distante esteve presente em cada passo dado. Que essa fraternidade e cumplicidade sejam eternas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Hirochi Kawai e Selma Kawai, por nunca medirem esforços para me darem o que há de melhor e nunca deixarem faltar nada, por sempre acreditarem em minhas escolhas, por sempre me apoiarem, por me ajudarem a levantar a cabeça e seguir em frente nos momentos mais difíceis. Sou muito grata pelo exemplo que sempre passaram de caráter e honestidade e pela batalha diária para me formar.

Ao meu orientador e grande amigo Professor Marcilio Nichi, pela sua paciência, determinação e pelas suas orientações, que sem estas eu não teria conseguido.

A todos os professores que me ensinaram desde a escrita até uma profissão, principalmente Professor Marcos Gomes Loureiro pelos ensinamentos além da Medicina Veterinária, pela sua amizade e pela grande confiança que depositou em mim, ao Professor Daniel Golcman que desde o início depositou sua confiança e mim e não mediu esforços para passar seus conhecimentos.

À todos os professores do Departamento de Reprodução Animal (VRA) pelos ensinamentos, sem vocês nada seria possível.

A todos os funcionários do Departamento de Reprodução Animal (VRA) que sempre estavam dispostos a ajudar.

À equipe do Laboratório de Andrologia: Diego, Andressa, Carol, Bárbara, Nívea por ajudarem quando necessário.

A todos os amigos do Departamento de Reprodução Animal (VRA) pelos momentos de descontração, pelos churrascos divertidíssimos e incansáveis experimentos.

Aos meus eternos amigos, Daniela Friedenberg, Danielle Gurgeira, Paulo Renato e Stefanie Brentzel, por estarem presentes nesses anos e fazerem dos meus dias os melhores.

À Guta e ao Cabral que contribuíram muito com esse experimento mudando a própria rotina de trabalho para nos ajudar com os animais necessários, compartilhando suas experiências e conhecimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro durante o Mestrado.

Muito obrigada a todos que foram citados e peço desculpas se esqueci de alguém, sem vocês não teria conseguido. Sou eternamente grata.

“Procure:

mais do que saber - dominar-se; mais do que agir - elevar; mais do que estudar - aprender;
mais do que pensar - discernir; mais do que falar - educar; mais do que aconselhar - servir;
mais do que escutar - compreender; mais do que perdoar - amparar; mais do que sofrer -
resignar-se; mais do que amar - sublimar” (LUIZ, 2010).

RESUMO

KAWAI, G. K. V. Efeito da carnosina na prevenção de crioinjúrias no sêmen de garanhões bons e maus congeladores. [Effect of carnosine on the protection against cryoinjuries in semen of good and bad freezers' stallions]. 2017. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

As espécies reativas de oxigênio são fundamentais na fisiologia espermática. No entanto, um desequilíbrio entre a produção e a capacidade antioxidante caracteriza o estresse oxidativo (EO). O espermatozoide é extremamente suscetível ao EO pois, dentre outras características, a membrana plasmática é rica em ácidos graxos poli-insaturados responsáveis por promoverem a fluidez necessária em processos fisiológicos como motilidade e fertilização. Por outro lado, essas insaturações são mais facilmente oxidadas e vulneráveis à peroxidação lipídica. Em função desta susceptibilidade, estas células dependem fortemente de compostos presentes no plasma seminal (PS) para a proteção contra esse evento. Dessa forma, a carnosina, dipeptídeo presente no PS pode ser uma das responsáveis pela proteção contra o acúmulo do MDA. No entanto, durante a criopreservação do sêmen equino é necessário retirar o PS. Em estudo recente, verificamos que esta remoção, torna os espermatozoides sensíveis ao subproduto extremamente deletério da peroxidação lipídica, o malondialdeído (MDA). Como a carnosina é removida junto com o plasma seminal durante a criopreservação, foram desenvolvidos 2 experimentos sequenciais visando a melhora da qualidade do sêmen criopreservado com adição de carnosina. Amostras de sêmen de sete garanhões foram tratadas com concentrações crescentes de carnosina adicionadas ao diluidor (1mM, 50mM e 100mM). Após a descongelação, as amostras foram divididas retrospectivamente em grupos de alta congelabilidade (AC: motilidade maior que 30%) e baixa congelabilidade (BC: motilidade menor que 30%). Amostras tratadas com 50mM apresentaram menor porcentagem de células com lesão de membrana plasmática e, quando tratadas com 100mM, células com maior amplitude do deslocamento lateral de cabeça. Amostras controle BC apresentaram menor porcentagem de células com DNA íntegro em relação às amostras AC. No entanto, houve um leve aumento na porcentagem de células com DNA íntegro em amostras BC com 100mM, não diferindo das amostras AC. Por outro lado, amostras BC criopreservadas com 50mM apresentaram maiores porcentagens de células com escore calculado de potencial de membrana mitocondrial e mais suscetíveis ao EO em relação ao controle. Apesar da proteção

parcial, a maior suscetibilidade à peroxidação lipídica torna-se um problema, especialmente pelo fato de que espermatozoides equinos são mais suscetíveis ao MDA. Um motivo para este efeito seria a afinidade da carnosina em reagir com açúcares, o que poderia influenciar negativamente a atividade mitocondrial e o *status* oxidativo, ao diminuir a produção de piruvato pela via glicolítica. Desta forma, no experimento 2, amostras BC foram tratadas com a combinação de carnosina (0 e 50mM) e piruvato (0 e 5mM) em arranjo fatorial 2x2. Verificou-se que o tratamento com piruvato (5mM) proporcionou menos células com baixa atividade mitocondrial. Por outro lado, a carnosina (50mM), promoveu maior motilidade total, progressiva e células rápidas. Houve uma tendência de aumento nas células com velocidade progressiva e atividade mitocondrial na combinação de tratamentos. Não houve diferença entre os grupos na suscetibilidade ao EO que, no entanto, correlacionou-se negativamente com células móveis, rápidas e integridade de membrana plasmática e acrossomal. Estes resultados indicam que subprodutos da peroxidação lipídica, sendo o principal deles o MDA, podem causar danos ao DNA, às mitocôndrias e à cinética espermática. Neste contexto, a carnosina (100mM) parece ter um leve efeito protetor ao DNA contra o acúmulo de MDA. Além disto, 50mM de carnosina parece auxiliar na manutenção da velocidade progressiva e atividade mitocondrial quando associada ao piruvato (5mM). Assim, a carnosina e o piruvato podem ser utilizados na prevenção de crioinjúrias em amostras de baixa congelabilidade.

Palavras-chave: Criopreservação espermática. Sêmen equino. Carnosina. Espécies reativas de oxigênio. Malondialdeído.

ABSTRACT

KAWAI, G. K. V. Effect of carnosine on the protection against cryoinjuries in semen of good and bad freezers' stallions. [Efeito da carnosina na prevenção de crioinjúrias no sêmen de garanhões bons e maus congeladores]. 2017. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Reactive oxygen species (ROS) plays a key role in the sperm physiology. However, an imbalance between ROS production and antioxidant capacity characterize the oxidative stress (OE). The spermatozoa are extremely susceptible to EO because, among other characteristics, the plasma membrane is rich in polyunsaturated fatty acids responsible for promoting fluidity necessary in physiological processes such as motility and fertilization. However, these unsaturations are more easily oxidized and vulnerable to lipid peroxidation. Due to this susceptibility, these cells strongly depend on compounds present in the seminal plasma (SP) to protect against this event. Thus, carnosine, a dipeptide present in SP of stallions, may be a key factor on the protection against MDA accumulation. Nevertheless, during the equine sperm cryopreservation process, SP is removed. In a recent study, we observed that seminal plasma removal led to an increased susceptibility of equine spermatozoa to extremely deleterious product of lipid peroxidation, malondialdehyde (MDA). As the carnosine is removed together with the seminal plasma during cryopreservation, two sequential experiments were developed aiming to improve the quality of stallion cryopreserved semen by means of carnosine therapy. Samples from seven stallions were treated with increasing concentrations of carnosine added to the extender (1mM, 50mM and 100mM) and submitted to cryopreservation. After thawing, samples were classified as high freezeability (HF: total motility greater than 30%) and low freezeability (LF: total motility lower than 30%). Samples treated with 50mM presented lower percentage of sperm showing plasma membrane damage and, when treated with 100mM, a greater amplitude of the lateral head displacement was observed. Untreated LF samples showed a lower percentage of cells showing intact DNA in relation to HF samples. By contrast, when LF samples were treated with 100mM, there was an increase in the percentage of cells with intact DNA, which was similar to the HF samples. On the other hand, LF samples cryopreserved with 50mM had a higher percentage of cells showing high calculated mitochondrial membrane potential score and increased susceptibility to OE in relation to the control. Despite the partial protection, the increased susceptibility to lipid peroxidation is a concern since equine spermatozoa is highly vulnerable to the MDA.

Those results could be due to the affinity of carnosine to react with sugars, which could negatively influence mitochondrial activity and an oxidative state by decreasing pyruvate production. Hence, in experiment 2, LF samples were treated with a combination of carnosine (0 and 50mM) and pyruvate (0 and 5mM) in a 2x2 factorial arrangement. We observed that samples treated with pyruvate (5mM) had decreased percentage of cells with low mitochondrial activity. On the other hand, carnosine (50mM) increased total motility, progressive motility and fast cells. We also observed a tendency to increased progressive velocity and mitochondrial activity in the combination of treatments. There was no difference on sperm susceptibility to OE between treatments. However, this variable correlated negatively with the percentage of motile and rapid cells as well as those showing intact membrane and acrosome. These results indicate that the byproduct of lipid peroxidation (MDA) may cause damage to DNA, mitochondria and sperm kinetics. In this context, carnosine (100mM) appears to have a mild protective effect on DNA against the accumulation of MDA. Furthermore, 50mM of carnosine seems to improve progressive velocity and mitochondrial activity when associated with pyruvate (5mM). Thus, carnosine and pyruvate can be used on cryoinjuries prevention in low freezeability samples.

Keywords: Sperm cryopreservation. Equine sperm. Carnosine. Reactive oxygen species. Malondialdehyde.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Glicação não enzimática de proteína por glicose e produtos finais de glicação.	26
Figura 2 -	Delineamento experimental	32
Figura 3 -	Efeito das diferentes concentrações de carnosina nas células com acrossomo íntegro e membrana plasmática lesionada (AIML, %) em amostras criopreservadas de equinos – São Paulo – 2017	40
Figura 4 -	Efeito das diferentes concentrações de carnosina na amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm) em amostras criopreservadas de equinos – São Paulo – 2017	40
Figura 5 -	Efeito das diferentes concentrações de carnosina no potencial de membrana mitocondrial (%) de amostras criopreservadas de equinos com alta e baixa congelabilidade – São Paulo – 2017	41
Figura 6 -	Efeito das diferentes concentrações de carnosina na suscetibilidade do espermatozoide ao estresse oxidativo ($\text{ng}/10^6\text{sptz}$) de amostras criopreservadas de equinos com alta e baixa congelabilidade – São Paulo – 2017.....	42
Figura 7 -	Efeito das diferentes concentrações de carnosina na integridade de DNA (%) de amostras criopreservadas de equinos com alta e baixa congelabilidade – São Paulo – 2017	43
Figura 8 -	Delineamento experimental	59
Figura 9 -	Efeito do piruvato (5mM) na porcentagem de células com atividade mitocondrial média (DABII, %, A) e atividade mitocondrial baixa (DAB III, %, B) de amostras criopreservadas de equinos com baixa congelabilidade – São Paulo – 2017	67
Figura 10 -	Efeito da carnosina (50mM) na motilidade total (%), A), motilidade progressiva (%), B) e células rápidas (%), C) de amostras criopreservadas de equinos com baixa congelabilidade – São Paulo – 2017.....	68
Figura 11 -	Efeito do piruvato (5mM) e da carnosina (50mM) na velocidade progressiva (VSL, %) de amostras criopreservadas de equinos com baixa congelabilidade – São Paulo – 2017	69
Figura 12 -	Efeito do piruvato (5mM) e da carnosina (50mM) na atividade mitocondrial (DAB I, A e DAB IV, B, %) em amostras criopreservadas de equinos com baixa congelabilidade – São Paulo – 2017	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Parâmetros avaliados pelo sistema computadorizado de análises espermáticas (CASA) Computer Assisted Sperm Analysis – São Paulo – 2017.....	35
Tabela 2 -	Parâmetros avaliados pelo sistema computadorizado de análises espermáticas (CASA) Computer Assisted Sperm Analysis – São Paulo – 2017.....	62
Tabela 3 -	Efeito da congelabilidade (alta e baixa), da carnosina e da interação congelabilidade * carnosina nas variáveis avaliadas pela análise espermática computadorizada (CASA), na análise concomitante da integridade de membrana plasmática e acrossomo, na avaliação do status oxidativo, função mitocondrial e integridade de DNA – São Paulo –2017.....	77
Tabela 4 -	Efeito das diferentes concentrações de carnosina nas variáveis de espermatozoides criopreservados de equinos – São Paulo – 2017	78
Tabela 5 -	Efeito da carnosina (0 e 50mM), do piruvato (0 e 5mM) e da interação carnosina * piruvato nas variáveis avaliadas pela análise espermática computadorizada (CASA), na análise concomitante da integridade de membrana plasmática e acrossomo, na avaliação do status oxidativo, função mitocondrial e integridade de DNA de amostras com alta congelabilidade – São Paulo –2017.	79
Tabela 6 -	Efeito da carnosina (0 e 50mM), do piruvato (0 e 5mM) e da interação carnosina * piruvato nas variáveis avaliadas pela análise espermática computadorizada (CASA), na análise concomitante da integridade de membrana plasmática e acrossomo, na avaliação do status oxidativo, função mitocondrial e integridade de DNA de amostras com baixa congelabilidade – São Paulo –2017.	80
Tabela 7 -	Efeito do piruvato (5mM) nas variáveis em amostras criopreservadas de equinos com baixa congelabilidade – São Paulo – 2017	81
Tabela 8 -	Efeito da carnosina (50mM) nas variáveis de espermatozoides criopreservados de equinos com baixa congelabilidade – São Paulo – 2017... ..	82

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	CAPÍTULO 1: Revisão de literatura	19
2.1	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	19
2.2	ESTRESSE OXIDATIVO SEMINAL	20
2.3	CRIOPRESERVAÇÃO	22
2.4	CARNOSINA	23
2.4.1	Descoberta e localização da carnosina em diferentes tecidos	23
2.4.2	Funções fisiológicas da carnosina	24
2.4.2.1	Função antienvhecimento	24
2.4.2.2	Função antioxidante	26
3	CAPÍTULO 2: Efeito da carnosina na criopreservação de amostras espermáticas com alta e baixa congelabilidade seminal provenientes de garanhões	29
3.1	INTRODUÇÃO	30
3.2	MATERIAL E MÉTODOS	32
3.2.1	Delineamento experimental	32
3.2.2	Local e animais experimentais	32
3.2.3	Colheita de sêmen	33
3.2.4	Processamento e análise seminal	33
3.2.4.1	Criopreservação do sêmen	33
3.2.4.2	Congelabilidade	33
3.2.4.3	Análise do sêmen descongelado	34
3.2.4.3.1	<i>Sistema computadorizado de análise espermática (CASA - Computer Assisted Sperm Analysis; Hamilton-Thorne)</i>	34
3.2.4.3.2	<i>Testes morfo-funcionais</i>	35
3.2.4.3.2.1	<i>Integridade de membrana plasmática e acrossomal</i>	35
3.2.4.3.2.2	<i>Potencial de membrana mitocondrial</i>	36
3.2.4.3.2.3	<i>Integridade de DNA</i>	37
3.2.4.3.2.4	<i>Atividade mitocondrial</i>	38
3.2.4.3.2.5	<i>Status oxidativo</i>	38
3.2.5	Análise estatística	39
3.3	RESULTADOS	39

3.4	DISCUSSÃO-----	43
	REFERÊNCIAS -----	49
4	CAPÍTULO 3: Efeito da carnosina e do piruvato na criopreservação espermática de amostras espermáticas com alta e baixa congelabilidade seminal provenientes de garanhões -----	56
4.1	INTRODUÇÃO-----	57
4.2	MATERIAL E MÉTODOS-----	58
4.2.1	Delineamento experimental -----	59
4.2.2	Local e animais experimentais -----	59
4.2.3	Colheita de sêmen -----	59
4.2.4	Processamento e análise do sêmen -----	60
4.2.4.1	Criopreservação do sêmen-----	60
4.2.4.2	Congelabilidade-----	60
4.2.4.3	Análise do sêmen descongelado-----	60
4.2.4.3.1	<i>Sistema computadorizado de análise espermática (Casa - Computer Assisted Sperm Analysis; Hamilton-Thorne)</i> -----	61
4.2.4.3.2	<i>Testes morfo-funcionais</i> -----	62
4.2.4.3.2.1	<i>Integridade de membrana plasmática e acrossomal</i> -----	62
4.2.4.3.2.2	<i>Potencial de membrana mitocondrial</i> -----	63
4.2.4.3.2.3	<i>Integridade de DNA</i> -----	64
4.2.4.3.2.4	<i>Atividade mitocondrial</i> -----	64
4.2.4.3.2.5	<i>Status oxidativo</i> -----	65
4.2.5	Análise estatística -----	66
4.3	RESULTADOS-----	66
4.4	DISCUSSÃO-----	70
	REFERÊNCIAS -----	73
5	CONCLUSÃO -----	83
	REFERÊNCIAS -----	84



Introdução

1 INTRODUÇÃO

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2014), o efetivo de equinos tem maior representatividade na região Sudeste e de acordo com os dados da Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil, a renda gerada no Complexo do Agronegócio do Cavalo no Brasil totalizou R\$16,15 bilhões em 2015 (LIMA; CINTRA, 2016). O uso da refrigeração e criopreservação seminal nas biotécnicas reprodutivas é uma área de crescente interesse na equinocultura, e apresenta vantagens logísticas no comércio de sêmen equino, na seleção de linhagens e desempenhos desejados, além de evitar o risco de exposição às doenças infectocontagiosas durante a estação reprodutiva (APARICIO et al., 2016).

No entanto, garanhões são selecionados com base no pedigree e desempenho atlético e, por essa razão, não são submetidos a pressão de seleção para a fertilidade. A prática de contornar a subfertilidade com o uso da reprodução assistida resultou em populações equinas com taxas de concepção significativamente menores do que outras espécies (GIBB; AITKEN, 2016), como ovinos e suínos (GIBB; LAMBOURNE; AITKEN, 2014). Portanto, faz-se necessária uma estratégia para aumentar a qualidade e capacidade fecundante do sêmen destes animais (ALVARENGA; NETO; PAPA, 2014). Embora seja possível criopreservar o sêmen equino; a criopreservação diminui a viabilidade celular e a capacidade de fecundação (BAILEY; BLODEAU; CORMIER, 2000; AGARWAL; SAID, 2005; THOMSON et al., 2009).

Neste contexto, uma das causas da diminuição da qualidade espermática pós-descongelamento é o estresse oxidativo, causado pela produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio (EROs). A retirada quase total do plasma seminal, procedimento realizado para concentrar os espermatozoides durante o processo de criopreservação, reduz a capacidade antioxidante e conseqüentemente aumenta a suscetibilidade dos espermatozoides ao estresse oxidativo (VASCONCELOS FRANCO et al., 2013). Este quadro é agravado, pois estas células apresentam reduzido citoplasma, fator limitante para a quantidade de antioxidantes enzimáticos intracelulares. Além disso, apresentam alta quantidade de ácidos graxos poli-insaturados, mais sensíveis à clivagem por radicais livres (DE LAMIRANDE; GAGNON, 1992).

Subprodutos da peroxidação lipídica podem ser tão ou mais deletérios que as EROs. Em estudo anterior, verificamos que espermatozoides equinos submetidos ao desafio com diferentes espécies reativas de oxigênio e ao subproduto da peroxidação lipídica

(malondialdeído, MDA), na presença do plasma seminal, foram extremamente suscetíveis ao radical hidroxil, o mais instável entre as EROs. No entanto, na ausência do plasma seminal, o malondialdeído mostrou-se extremamente deletério. Este resultado pode indicar que alguma substância no plasma seminal possui o papel de inativar os produtos da peroxidação lipídica (KAWAI et al., 2017). Dentre os componentes do plasma seminal, a carnosina pode ser um dos responsáveis pela proteção contra o acúmulo de MDA e seus efeitos deletérios (HIPKISS et al., 1997; HIPKISS et al., 1998; GUIOTTO et al., 2007; CHENG et al., 2011).

Ademais, estudos demonstraram que a carnosina pode ser um agente antiglicante (HIPKISS; MICHAELIS; SYRRIS, 1995; HIPKISS et al., 1997) de ocorrência natural, pois protege peptídeos e proteínas contra modificações induzidas por uma variedade de cetonas e aldeídos deletérios, incluindo o produto da peroxidação lipídica, o malondialdeído (HIPKISS et al., 1997). Neste contexto, este dipeptídeo poderia ser aplicado na terapia espermática durante o processo de criopreservação, que sabidamente causa um desequilíbrio oxidativo e gera produtos da peroxidação lipídica, extremamente citotóxicos (VASCONCELOS FRANCO et al., 2013). Apesar do efeito protetor que a carnosina pode conferir às células, esta atua como inibidor competitivo da glicação não enzimática de proteínas e reage rapidamente com os açúcares fosforilados intermediários da glicólise, particularmente gliceraldeído-3-fosfato e diidroxiacetona fosfato (HOLLIDAY; MCFARLAND, 1996). Em síntese, a carnosina elimina os intermediários da glicólise, reduz a produção de piruvato via glicólise e, portanto, pode reduzir a produção de ATP pelo ciclo do ácido cítrico e fosforilação oxidativa. Este efeito poderia ser revertido com a suplementação celular de piruvato. Desta forma, o efeito deletério da carnosina seria compensado pelo estímulo exógeno de piruvato, mantendo a produção energética celular (HOLLIDAY; MCFARLAND, 1996).

Baseado nessas assertivas, o presente estudo foi estruturado em três capítulos. O primeiro capítulo contempla uma revisão de literatura sobre os pontos apresentados. O segundo e terceiro capítulos foram redigidos no formato de artigo científico. O objetivo do segundo capítulo foi avaliar o possível efeito protetor da carnosina no processo de criopreservação espermática de amostras de ganhões com alta e baixa congelabilidade. Por fim, o objetivo do terceiro capítulo foi avaliar o possível efeito sinérgico entre as moléculas de piruvato e carnosina na funcionalidade e homeostase oxidativa dos espermatozoides pós-descongelação de amostras de ganhões com baixa congelabilidade.



Capítulo 1

2 CAPÍTULO 1: Revisão de literatura

Esta revisão de literatura retrata o processo de produção das espécies reativas de oxigênio, o estresse oxidativo seminal, a criopreservação de espermatozoides equinos, e a importante função das moléculas carnosina e piruvato nas crioinjúrias espermáticas.

2.1 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Espécies reativas de oxigênio (EROs) são subprodutos do metabolismo aeróbico (SCHIEBER; CHANDEL, 2014). Algumas destas EROs se enquadram na categoria de radicais livres, definidos por átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica (NICHII, 2003). Os espermatozoides, assim como as células somáticas, possuem a capacidade de gerar e degradar EROs, que em equilíbrio com antioxidantes são essenciais para que a célula possa realizar suas funções fisiológicas. (LUSHCHAK, 2014).

O ânion superóxido (O_2^-) origina-se a partir de uma molécula de oxigênio pela adição espontânea de um elétron. Não é altamente reativo, pois não apresenta a capacidade de penetrar nas membranas lipídicas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; ANDRADE et al., 2010). Sua formação ocorre espontaneamente principalmente no ambiente aeróbico rico em elétrons, na membrana mitocondrial, através da cadeia respiratória e também por flavoenzimas, lipoxigenases e cicloxigenases (NORDBERG; ARNÉR, 2001; MAIA; BICUDO, 2009). Esta é a ERO mais comum, que sofre rápida dismutação espontânea ou ação enzimática da superóxido dismutase tornando-se peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BALL; VO; BAUMBER, 2001).

O peróxido de hidrogênio não é um radical livre, porém é uma ERO de grande importância devido a sua capacidade de penetrar facilmente em membranas biológicas (BALL; VO; BAUMBER, 2001; SILVA; GUERRA, 2010). Desempenha um papel formador de radical como um intermediário na produção de moléculas de EROs mais reativas, como o radical hidroxil, por meio de oxidação de metais de transição (NORDBERG; ARNÉR, 2001; MAIA; BICUDO, 2009).

O radical hidroxil (OH^-) apresenta alta reatividade com biomoléculas, considerado o radical livre que possui maior capacidade de proporcionar danos biológicos. É formado a partir da reação de Fenton, onde o peróxido de hidrogênio sofre uma reação catalisada por íons metálicos (Fe^{2+} ou Cu^+): $H_2O_2 + Cu^+/Fe^{2+} \rightarrow OH^- + OH^- + Cu^{2+}/Fe^{3+}$ (NORDBERG;

ARNÉR, 2001; ANDRADE et al., 2010).

Este radical é considerado o mais deletério para o organismo, pois reage rapidamente com biomoléculas e pode desencadear a peroxidação dos lipídios nas membranas celulares (MAIA; BICUDO, 2009; SILVA; GUERRA, 2010). Além disso, o OH^\cdot proporciona danos aos ácidos nucleicos, carboidratos, proteínas e lipídeos quando o sistema celular encontra-se em desequilíbrio oxidativo, gerando modificações estruturais e funcionais, morte celular e ruptura da cadeia de DNA (SILVA; GUERRA, 2010)

As EROs atuam na regulação de processos fisiológicos como a hiperativação espermática, capacitação, indução da reação acrossomal, ligação entre espermatozoide e oócito e penetração através da zona pelúcida (DE LAMIRANDE et al., 1997). Em condições fisiológicas, células somáticas possuem sistemas de defesa antioxidante enzimático, não enzimático, citoplasmático e extracelular, que podem atuar removendo o agente antes que ele cause lesão ou reparando a lesão já ocorrida (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; MAIA; BICUDO, 2009). Esse sistema de defesa inclui as enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR), e agentes não enzimáticos como ácido ascórbico e α -tocoferol (AITKEN, 1995; MAIA; BICUDO, 2009). Cada espécie reativa de oxigênio possui um mecanismo antioxidante de eleição (PISOSCHI; POP, 2015), porém quando ocorre um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a capacidade antioxidante da célula, o excesso de EROs desafia os limites intracelulares de defesa antioxidante do espermatozoide, caracterizando o estresse oxidativo (SIKKA, 2004; SILVA; GUERRA, 2010).

2.2 ESTRESSE OXIDATIVO SEMINAL

O estresse oxidativo pode ocorrer tanto pela formação exacerbada de EROs quanto pela redução da capacidade de sistemas antioxidantes endógenos em combater injúrias oxidativas. Desta forma, o estresse oxidativo causa danos estruturais em biomoléculas, DNA, lipídios, carboidratos e proteínas, bem como outros componentes celulares (NICHI et al., 2006; PISOSCHI; POP, 2015). Além disso, o estresse oxidativo atua na patogênese e fisiopatologia de doenças crônicas, como doenças neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer, doença de Huntington e esclerose lateral amiotrófica), enfisema, doenças cardiovasculares e inflamatórias, cataratas e câncer (PISOSCHI; POP, 2015).

Estudos anteriores verificaram que espermatozoides são particularmente suscetíveis ao ataque das EROs por apresentarem reduzido citoplasma, fator limitante para a quantidade de

antioxidantes citoplasmáticos. Além disso, apresentam grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS) nas membranas, facilmente oxidados. Estes possuem um papel importante na fisiologia espermática, promovendo a fluidez necessária para participar nos eventos de fusão de membrana associada com a fertilização. Por outro lado, os ácidos graxos poli-insaturados tornam os espermatozoides suscetíveis ao estresse oxidativo, as ligações carbono hidrogênio adjacentes às ligações duplas são mais instáveis e assim, mais suscetíveis ao sequestro do hidrogênio pelas EROs (NICHII et al., 2007).

Com a decomposição dos hidroperóxidos lipídicos, ocorre a formação do malondialdeído (MDA), um aldeído de cadeia curta. Sua concentração tem sido utilizada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica em sistemas biológicos, células e tecidos (BONNES-TAOUREL; GUÉRIN; TORREILLES, 1992). O MDA apresenta alta reatividade e longevidade, além da capacidade em atuar dentro e fora das células, interagindo com biomoléculas, tais como ácidos nucleicos e proteínas causando danos irreversíveis nos mecanismos celulares (DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005). Diversos estudos relacionam o MDA como fator importante em diversos eventos patológicos. Por ser um potente agente neurotóxico e apresentar meia vida maior do que as espécies reativas de oxigênio (ESTERBAUER; SCHAUR; ZOLLNER, 1991), o acúmulo é crítico na patogênese do envelhecimento (NG et al., 2005), isquemia cerebral, doença de Alzheimer (LOVELL; MARKESBERY, 2007), doença de Parkinson e esclerose amiotrófica (SMITH, Y. et al., 2012). Além disso, os produtos da peroxidação lipídica podem ser extremamente citotóxicos ao espermatozoide (HIPKISS et al., 1998). Dessa forma, o estresse oxidativo leva a infertilidade, diminuição da motilidade espermática, peroxidação de lipídios, aumento nos danos de DNA e diminuição da ligação espermatozoide-oócito (KO; SABANEKH; AGARWAL, 2014; AITKEN et al., 2015).

O estresse oxidativo espermático é uma condição multifatorial, podendo ser causado por alterações na espermatogênese, varicocele, criptorquidismo, torção testicular, infecção, processo inflamatório ou senescência (KO; SABANEKH; AGARWAL, 2014). Ademais, o estresse oxidativo seminal em humanos está relacionado às toxinas provenientes do tabagismo, consumo de álcool, radiações ionizantes, tratamentos quimioterápicos e contato com pesticidas (PISOSCHI; POP, 2015). Da mesma forma, técnicas de conservação espermática, particularmente a criopreservação, causam morte celular e danos oxidativos subletais à população sobrevivente, sendo que um dos principais fatores relacionados a estes danos seria o desequilíbrio oxidativo (PEÑA et al., 2015).

2.3 CRIOPRESERVAÇÃO

A criopreservação seminal é uma importante ferramenta para a reprodução assistida, um crescente interesse da equinocultura. No entanto, estima-se que apenas 30-40% dos garanhões produzam células adequadas para a criopreservação (OLACIREGUI et al., 2014). Foi relatada também uma grande variação entre indivíduos na criotolerância dos espermatozoides durante o processo de congelamento e descongelamento (ALVARENGA et al., 2004). Esses fatores são limitantes para a utilização de sêmen criopreservado comercialmente. Dessa forma, a melhoria do protocolo de congelamento e do crioprotetor é de grande importância (OLACIREGUI et al., 2014).

A criopreservação induz muitos danos irreversíveis ao espermatozoide que resultam na redução da fertilidade comparando ao sêmen *in natura* ou refrigerado (MORAES et al., 2015). O processo de criopreservação e descongelamento reduz a integridade acrossomal, viabilidade e motilidade dos espermatozoides. Muitos dos defeitos deletérios induzidos pela criopreservação podem ser atribuídos ao estresse osmótico. Quando o espermatozoide atinge temperaturas abaixo de 0°C, ocorre a formação de cristais de gelo extracelulares e um aumento na osmolaridade de qualquer líquido remanescente ao qual os espermatozoides estão expostos, colocando as células sob extrema tensão osmótica (GIBB; AITKEN, 2016).

Quando a água externa congela, o gelo resultante é "água pura" intercalada com canais descongelados de solutos altamente concentrados. As células permanecem nestes canais descongelados onde são expostas a condições hiperosmóticas e conseqüentemente sofrem desidratação. A velocidade à qual as células são arrefecidas determina a extensão e duração da desidratação celular e a hipertonidade à qual são expostas. De fato, se o arrefecimento é suficientemente rápido, a água intracelular pode congelar em cristais de gelo antes que esta possa deixar a célula, gerando danos celulares (LOOMIS; GRAHAM, 2008).

Ademais, um dos fatores responsáveis pela redução da qualidade espermática durante o processo de criopreservação é a produção exacerbada de EROs pelos espermatozoides (MORAES et al., 2015). Estudos evidenciam que um dos possíveis mecanismos responsáveis por este desequilíbrio oxidativo é a disrupção da mitocôndria, principal fonte de EROs (AGARWAL et al., 2014). Além da produção excessiva de EROs durante a criopreservação, ocorre uma redução da capacidade antioxidante dos espermatozoides pós-descongelamento, conferindo maior suscetibilidade destas células ao estresse oxidativo (BAILEY; BILODEAU; CORMIER, 2000). Adicionalmente, durante a criopreservação do sêmen de algumas espécies, como os equinos, é necessária a remoção do plasma seminal, importante fonte de

antioxidantes para o espermatozoide, podendo deixar o espermatozoide ainda mais vulnerável (ALVARENGA; PAPA; RAMIRES NETO, 2016).

Neste contexto, fica evidente a necessidade de prevenir o estresse oxidativo durante a criopreservação seminal, com o intuito de proteger as estruturas espermáticas durante este procedimento e aumentar a capacidade fecundante. Portanto, para prevenir as crioinjúrias oxidativas, diversos pesquisadores vêm utilizando terapias celulares por meio da suplementação com antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos como catalase, glutathione peroxidase (BAUMBER et al., 2003), glutathione reductase (BALL, 2008), quercetina (GIBB, Z. et al., 2013), α -tocoferol (RICH et al., 1984), superóxido dismutase (COCCHIA et al., 2011) e ácido ascórbico (AURICH et al., 1997).

Além das injúrias causadas pelas espécies reativas de oxigênio, subprodutos da peroxidação lipídica, como o malondialdeído (MDA), podem ser tão ou mais deletérios aos espermatozoides que as EROs (HIPKISS et al., 1998). Entretanto, antioxidantes convencionais não são capazes de debelar estes produtos. Portanto, uma alternativa ao tratamento antioxidante, seria a terapia espermática durante o processo de criopreservação utilizando a suplementação com carnosina. Isto porque este dipeptídeo pode ter tanto função antioxidante como sequestradora de produtos da peroxidação lipídica (CHENG et al., 2011).

2.4 CARNOSINA

2.4.1 Descoberta e localização da carnosina em diferentes tecidos

A carnosina foi descoberta em (1900) pelo químico russo Gulewitsch, W. I. É um dipeptídeo de ocorrência natural (BOLDYREV; ALDINI; DERAIVE, 2013), sintetizado pelos precursores β -alanina e L-histidina pela ação da carnosina sintase e degradado pela carnosinase, a qual regula níveis celulares (DI PIERRO et al., 2011). Este dipeptídeo foi identificado em espermatozoides suínos (DUCCI et al., 2006), no plasma epididimal de suínos, ovinos e coelhos (JONES, 1978), no espermatozoide e plasma seminal de garanhões (DUCCI et al., 2005).

A carnosina pode ser encontrada no cérebro, músculo esquelético, coração, olhos e tecidos (BOLDYREV; ALDINI; DERAIVE, 2013). Existe uma grande variação na concentração de carnosina e seus análogos nos diferentes mamíferos. Em equinos, os valores encontrados podem variar entre 4 e 6 g/kg (peso líquido) nos músculos (BOLDYREV; ALDINI; DERAIVE, 2013). Em relação à distribuição tecidual, o músculo esquelético e o

bulbo olfatório apresentam maiores concentrações, onde mais de 99% da carnosina presente no organismo pode ser encontrado no músculo esquelético (BOLDYREV; ALDINI; DERAIVE, 2013). Segundo DUNNETT et al. (2002), o músculo esquelético equino pode exceder 100 mmol/kg de carnosina, e pode ainda ser encontrada na pele e tecidos gastrointestinais (BRANHAM et al., 2011). Sua função é proteger estas células, aumentando a meia vida celular. Os níveis de carnosina encontrados nos tecidos e principalmente nos músculos estão diretamente relacionados com o tempo de vida máximo em mamíferos (BOLDYREV; ALDINI; DERAIVE, 2013).

2.4.2 Funções fisiológicas da carnosina

A carnosina é um composto muito solúvel em água (GARIBALLA; SINCLAIR, 2000; BOLDYREV; ALDINI; DERAIVE, 2013), considerada um agente oxidante e eliminador de radicais livres, podendo atuar como um tampão fisiológico (DUNNETT et al., 2002; DI PIERRO et al., 2011). Outras funções fisiológicas descritas incluem ação cicatrizante (DUNNETT et al., 2002), neurotransmissora (BRANHAM et al., 2011), antienvelhecimento e quelante de íons metálicos (HIPKISS et al., 1997). Além disso, também diminui o teor de 8-hidroxi guanina (produto da oxidação do DNA) de fibroblastos humanos (HIPKISS, 1998). Segundo Cheng e colaboradores (2011), antioxidantes convencionais não apresentam função anti-*cross-linking* (capacidade de impedir que ocorram ligações entre moléculas lineares produzindo polímeros tridimensionais com alta massa molar e de estrutura mais rígida), não são capazes de debelar o MDA ou de reverter injúrias celulares, essas funções são únicas da carnosina. Apesar de sua exata função biológica não estar totalmente esclarecida, muitos estudos indicam que apresenta um vasto potencial antioxidante (BRANHAM et al., 2011).

2.4.2.1 Função antienvelhecimento

Segundo Hipkiss et al. (1998), a carnosina atua na diminuição da velocidade de senescência e aumento no tempo de vida (limite de Hayflick) de culturas de fibroblastos humanos. Devido à capacidade de atrasar a senescência em culturas de fibroblastos humanos, reverter o fenótipo senescente em culturas de células de roedores, aumentar o tempo de vida e combater os efeitos da reação de Maillard (uma das principais reações responsáveis pelo envelhecimento), o dipeptídeo carnosina é chamado de agente antienvelhecimento. O envelhecimento está associado com a alta produção de radicais livres, bem como a glicação

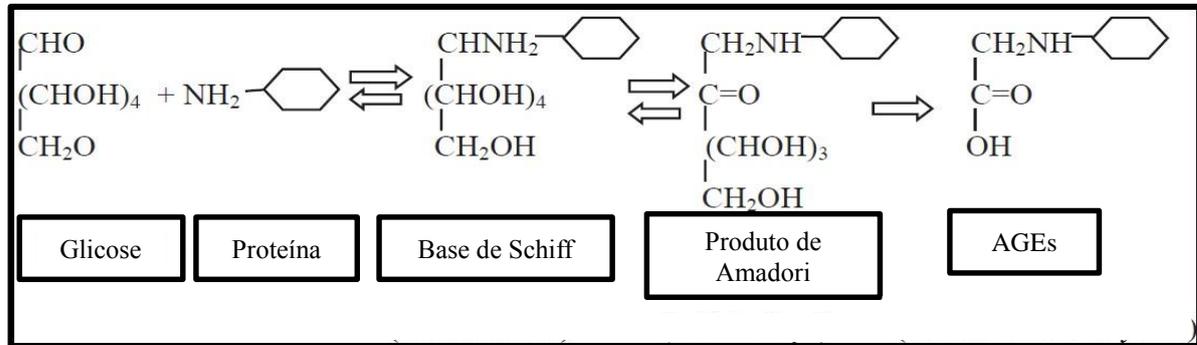
não enzimática (Reação de Maillard) das proteínas (HIPKISS et al., 1998). Além disto, o envelhecimento celular e a senescência são frequentemente associados ao encurtamento de telômeros. Segundo a teoria levantada por Hayflick, a cada divisão celular ocorre uma perda progressiva de telômeros, o que determina que cada célula possua um número finito de divisões (HAYFLICK, 1965). Shao e colaboradores (2004) relataram que a adição de 20mM de carnosina em fibroblastos de camundongos resultou no declínio significativo do desgaste do comprimento dos telômeros, porém, o mecanismo responsável por essa modificação não foi elucidado (HIPKISS; BAYE; DE COURTEN, 2016).

Como característica do envelhecimento, as proteínas sofrem diversas modificações, como a desaminação, oxidação e glicação não enzimática. A reação de Maillard ocorre pela reação entre um carboidrato e um grupo amina, começando com a reação inicial de um açúcar com uma proteína, processo conhecido como glicação não enzimática (THORPE; BAYNES, 1996). Com a interação desses compostos, ocorre a formação reversível de base de Schiff, o primeiro produto da glicação de proteína, gerada pela condensação de um grupamento carbonila de um açúcar redutor, como a glicose (BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2009). Esta base é relativamente instável e sofre um rearranjo gerando produtos de Amadori após o rearranjo dos produtos da primeira glicação, tornando essa estrutura mais estável (NAGARAJ; SHIPANOVA; FAUST, 1996). Os produtos de Amadori gerados ainda possuem grupos carbonilas reativos, que se condensam com grupos aminas primários acessíveis, dando origem aos produtos avançados da reação de Maillard (BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2009). Durante a formação dos produtos avançados da reação de Maillard (Figura 1), são geradas espécies reativas de oxigênio (EROs), promovendo o estresse oxidativo (BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2009). O produto final da peroxidação induzida por espécies reativas de oxigênio é o malondialdeído (MDA, principal produto da peroxidação lipídica), uma substância com grande potencial de lesar polipeptídeos conhecidos como indutores de *cross-linking* em proteínas (ligações entre moléculas lineares produzindo polímeros tridimensionais com alta massa molar e conseqüentemente tornando sua estrutura mais rígida) (HIPKISS et al., 1997).

Dessa forma, estudos indicam que a carnosina atenua a lesão celular induzida tanto pela reação de Maillard (ALHAMDANI; AL-AZZAWIE; ABBAS, 2007) como pelo MDA (GUIOTTO et al., 2007). A carnosina atua contra os danos induzidos pelo MDA a partir da reação com um aldeído, evitando os danos a proteínas importantes. A estrutura da carnosina torna este peptídeo prontamente glicável por aldeídos de açúcar. A carnosina se prende aos aldeídos derivados da peroxidação lipídica, trabalhando como nucleófilos sacrificiais (aldeído

sequestrantes), e macromoléculas celulares, atenuando desta forma os danos e progressão do processo oxidativo (BURCHAM et al., 2002).

Figura 1: Glicação não enzimática de proteína por glicose e produtos finais de glicação.



Fonte: Modificada de Neelofar; Ahmad (2015)

2.4.2.2 Função antioxidante

A atividade antioxidante da carnosina é mediada por diferentes mecanismos que envolvem a capacidade de quelar íons metálicos, debelar EROs e radical hidroxil (BOLDYREV; ALDINI; DERAIVE, 2013). Devido a hidrossolubilidade, a carnosina atua como um sistema antioxidante no citosol, onde mediadores de oxidação como metais de transição e radicais de oxigênio estão mais presentes (GARIBALLA; SINCLAIR, 2000).

Íons de metais de transição são descritos por exercer importante função em processos envolvendo radicais livres em sistemas biológicos. De fato, o cobre ou ferro podem catalisar a formação de espécies reativas de oxigênio através da reação de Haber-Weiss e Fenton resultando em danos oxidativos (TORREGGIANI, 1999). Em concentrações fisiológicas, a carnosina reage diretamente com ânion superóxido, assim como a superóxido dismutase. Essa reação é baseada na habilidade de formar um complexo de transferência de carga com o radical superóxido, o qual muda sua reatividade. A carnosina também inibe o radical hidroxil, processo no qual resulta em um intermediário razoavelmente estável e menos reativo que o hidroxil, oriundo de uma reação de eliminação de água catalisada por bases. Na presença de cobre, ocorre a rápida oxidação da carnosina por OH⁻ e produz produtos de adição de OH⁻ no anel imidazólico, sendo o grupo imidazol um local preferido para a ligação do OH⁻ (BOLDYREV; ALDINI; DERAIVE, 2013).

Este dipeptídeo foi identificado em espermatozoides suínos (DUCCI et al., 2006), no plasma epididimal de suínos, ovinos e coelhos (JONES, 1978), no espermatozoide e plasma

seminal de garanhões (DUCCI et al., 2005). No entanto, a remoção do plasma seminal durante o processamento do sêmen equino pode aumentar a suscetibilidade dos espermatozoides ao estresse oxidativo devido à remoção concomitante de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, bem como da carnosina. Assim, a retirada quase total do plasma seminal durante o processo de criopreservação na espécie equina exige uma proteção exógena contra danos oxidativos (VASCONCELOS FRANCO et al., 2013).



Capítulo 2

3 CAPÍTULO 2: Efeito da carnosina na criopreservação de amostras espermáticas com alta e baixa congelabilidade seminal provenientes de garanhões

RESUMO

Sabe-se que há uma grande variabilidade na criotolerância de amostras seminais equinas. Acredita-se que esta variação possa estar relacionada à raça e ao próprio indivíduo. Um dos possíveis fatores para esta variação está relacionado ao efeito do plasma seminal, que contém inúmeras substâncias que possuem um papel importante na fisiologia espermática. Verificamos em um estudo anterior, que a remoção do plasma seminal aumentou a sensibilidade do espermatozoide equino ao subproduto da peroxidação lipídica, malondialdeído (MDA). No entanto, durante a criopreservação do sêmen de equinos é necessário retirar o plasma seminal. A carnosina, dipeptídeo presente no plasma seminal, é conhecido por proteger os espermatozoides contra efeitos deletérios do MDA. Desta forma, amostras de garanhões de alta (AC, motilidade > 30%) e baixa (BC, motilidade <30%) congelabilidade foram avaliadas após criopreservação com adição de diferentes concentrações de carnosina (1, 50 e 100mM de carnosina). Não houve efeito do tratamento com carnosina nas variáveis relacionadas à cinética enzimática, com exceção de um aumento na amplitude do deslocamento lateral da cabeça nas amostras tratadas com 100mM de carnosina, possivelmente relacionado à uma hiperativação precoce. Amostras do grupo BC apresentaram menor integridade de DNA quando comparadas às amostras controle do grupo AC. No entanto, quando tratadas com 100mM de carnosina, houve um aumento na porcentagem de células com DNA íntegro em amostras do grupo BC, não diferindo das amostras do grupo AC, indicando um possível papel protetor da carnosina. No entanto, amostras do grupo BC criopreservadas com 50mM de carnosina apresentaram um maior escore de potencial de membrana mitocondrial e uma maior suscetibilidade ao estresse oxidativo, comparando com o grupo controle e com amostras do grupo AC. Estes resultados indicam que a carnosina na concentração de 50mM parece ter um efeito protetor parcial ao DNA contra o acúmulo de MDA. No entanto, o *status* mitocondrial e oxidativo parecem ser prejudicados nas amostras BC. Mais estudos são necessários para verificar as causas dos possíveis resultados contraditórios encontrados.

3.1 INTRODUÇÃO

A produção de equinos movimentada por ano cerca de 7,5 bilhões de reais (DE ALMEIDA; SILVA, 2010). De acordo com os dados da Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil, a renda gerada no Complexo do Agronegócio do Cavalo no Brasil totalizou R\$16,15 bilhões em 2015 (LIMA; CINTRA, 2016). Biotécnicas reprodutivas estão em desenvolvimento constante, como os processos de refrigeração e criopreservação seminal.

A utilização de sêmen criopreservado alcançou grande importância devido à possibilidade de transportar e armazenar o material genético de um garanhão com alto valor zootécnico e de aumentar a relação égua/garanhão, controlar doenças infectocontagiosas e utilizar o garanhão de maneira mais eficiente e segura durante a estação reprodutiva (NASCIMENTO et al., 2008). No entanto, a criopreservação e a descongelamento desestabilizam as membranas espermáticas que sofrem peroxidação lipídica em decorrência da ação de espécies reativas de oxigênio, alterando funções espermáticas como motilidade, comprometendo assim a capacidade dos espermatozoides em se ligarem à zona pelúcida (AVANZI et al., 2011).

Neste contexto, uma das principais causas para a diminuição da qualidade espermática pós-criopreservação é o estresse oxidativo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Além disso, subprodutos do estresse oxidativo podem ser tão ou mais deletérios que as EROs (BONNETAUREL; GUÉRIN; TORREILLES, 1992). Os organismos possuem sistemas finamente regulados para manter níveis fisiológicos de EROs. Contudo, em determinadas circunstâncias como esgotamento de reservas de antioxidantes, este equilíbrio pode ser perturbado (LUSHCHAK, 2014).

Por outro lado, a suplementação com antioxidantes é eficaz apenas quando o sistema alvo está em estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1985; NICHI, 2009) e uma concentração ideal é necessária para manter funções fisiológicas como motilidade, capacitação e reação acrossomal (DARR et al., 2016). Assim, o excesso de antioxidantes pode ser ineficaz ou até mesmo inibir o papel fisiológico das EROs (DE LAMIRANDE et al., 1997; NICHI, et al., 2007). A escolha do antioxidante é outro fator imprescindível, pois o espermatozoide de uma determinada espécie animal pode ser mais suscetível a uma ERO específica e, cada ERO tem seu antioxidante preferencial (NICHI, 2009).

Em estudo anterior, verificamos que espermatozoides equinos submetidos ao desafio com diferentes espécies reativas de oxigênio e ao MDA, na presença do plasma seminal, o radical hidroxil apresentou-se mais deletério. No entanto, na ausência do plasma seminal, os

espermatozoides foram extremamente suscetíveis ao malondialdeído (KAWAI et al., 2017), indicando que alguma substância no plasma seminal é capaz de inativar os produtos da peroxidação lipídica que podem ser tão ou mais deletérios que as EROs (BONNES-TAOUREL; GUÉRIN; TORREILLES, 1992). Este dado é de considerável importância uma vez que, para a criopreservação do sêmen de equinos é necessário retirar o plasma seminal, o que pode reduzir a capacidade antioxidante e conseqüentemente aumentar a suscetibilidade dos espermatozoides ao estresse oxidativo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Neste caso, substâncias que combatam o MDA podem representar uma terapia interessante para a melhora da qualidade pós-descongelamento, especialmente para espermatozoides com baixa criotolerância.

Dentre os componentes presentes no plasma seminal, a carnosina pode ser um dos responsáveis pela proteção contra o acúmulo de MDA e seus efeitos deletérios (HIPKISS, et al., 1997; HIPKISS et al., 1998; GUIOTTO et al., 2007; CHENG et al., 2011). A carnosina é um dipeptídeo sintetizado pelos precursores β -alanina e L-histidina pela ação da carnosina sintase e degradado pela carnosinase, a qual regula níveis celulares (DI PIERRO et al., 2011). Este dipeptídeo foi identificado em espermatozoides suínos (DUCCI et al., 2006), no plasma epididimal de suínos, ovinos e coelhos (JONES, 1978), no espermatozoide e plasma seminal de garanhões (DUCCI et al., 2005). É considerado um agente oxidante e eliminador de radicais livres, pode atuar como um tampão fisiológico (DUNNETT et al., 2002; DI PIERRO et al., 2011), possui ação cicatrizante (DUNNETT et al., 2002), neurotransmissora (BRANHAM et al., 2011), antienvhecimento, pode quelar íons metálicos (HIPKISS, ALAN R et al., 1997) e diminuir o teor de 8-hidroxiguanina (produto de oxidação do DNA) de fibroblastos humanos (HIPKISS, 1998). Este dipeptídeo apresenta atividade antioxidante mediada por diferentes mecanismos que envolvem a capacidade de quelar de íons metálicos, debelar EROs (BOLDYREV; ALDINI; DERAIVE, 2013) e atuar contra os danos induzidos pelo malondialdeído a partir da reação com um aldeído, evitando modificações de proteínas importantes (BURCHAM et al., 2002).

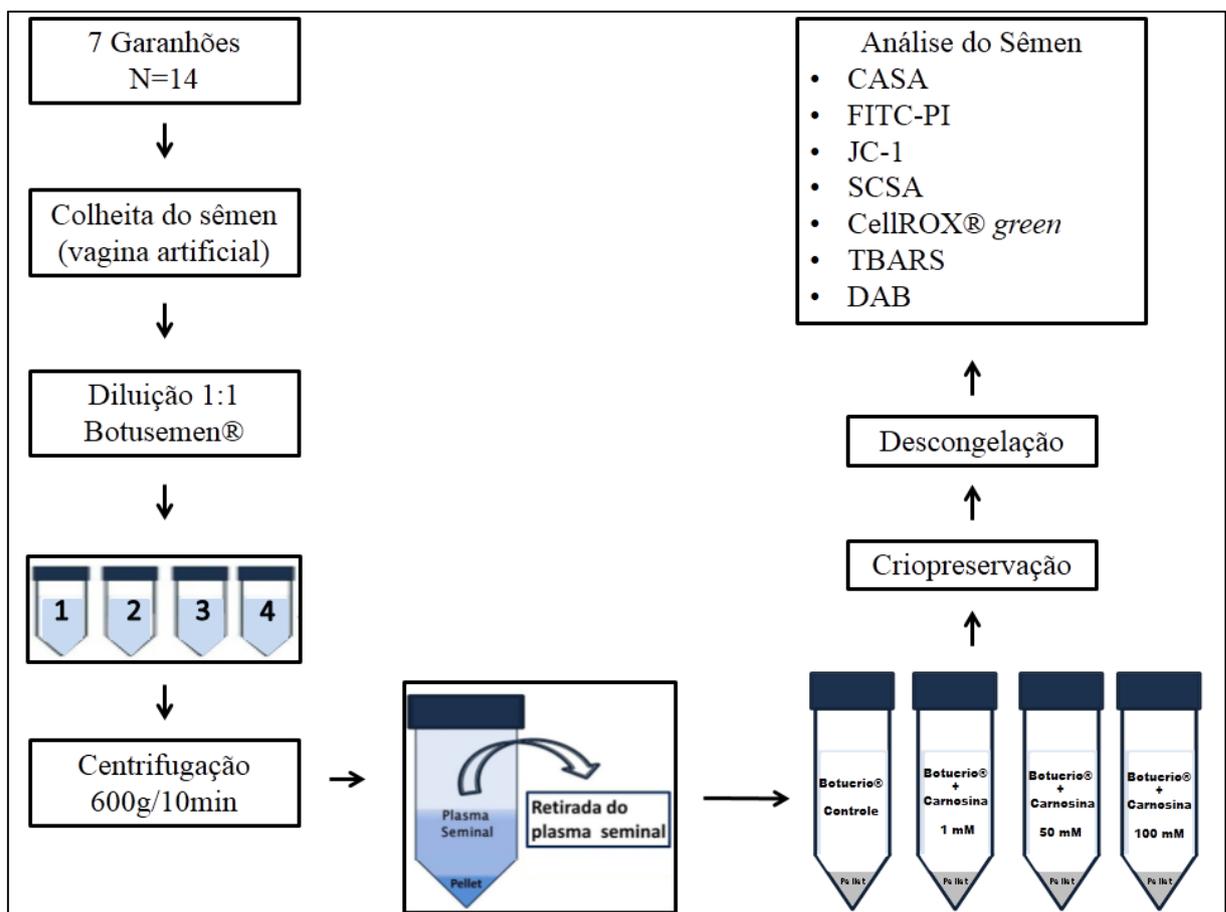
Em face do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o possível efeito protetor da carnosina no processo de criopreservação espermática de amostras de garanhões com alta e baixa congelabilidade.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente experimento foi realizado de acordo com as diretrizes éticas para experimentos com animais e foi aprovado pelo Comitê de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (protocolo número 4149070115). A menos que indicado de outra forma, os reagentes utilizados no experimento foram adquiridos da empresa Sigma Chemical® (St. Louis, MO, EUA).

3.2.1 Delineamento experimental

Figura 2 – Delineamento experimental



3.2.2 Local e animais experimentais

As colheitas e avaliações iniciais do sêmen foram realizadas na Fazenda Santa Rita II localizada na cidade de Piracaia - SP. As avaliações do sêmen descongelado foram realizadas no Laboratório de Andrologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da

Universidade de São Paulo (USP), no Departamento de Reprodução Animal (VRA) em São Paulo, SP. Foram utilizados 7 garanhões da raça Mangalarga Paulista, com idades variando entre 3 e 8 anos, alojados na respectiva propriedade sob manejo semi-intensivo, com água e sal *ad libitum* e suplementação concentrada diária.

3.2.3 Colheita de sêmen

Após prévia higienização do pênis com solução salina aquecida a 37°C e compressa umedecida, duas colheitas com intervalo de sete dias foram realizadas por vagina artificial modelo Botupharma® (Botupharma – Botucatu – Ltda/ME, Botucatu, São Paulo, Brasil), com auxílio de uma égua em estro, devidamente contida fisicamente. Todos os ejaculados foram filtrados para remoção de gel e sujidades no momento da colheita.

3.2.4 Processamento e análise seminal

3.2.4.1 Criopreservação do sêmen

Previamente ao processamento, cada ejaculado foi avaliado quanto aos padrões de motilidade, vigor e concentração a partir da análise ao microscópio óptico e quanto ao volume em tubo de fundo cônico de 50mL. Cada ejaculado foi dividido em quatro tubos de fundo cônico de 15mL e centrifugado a 400xg durante 10 minutos para a retirada do plasma seminal. Os *pellets* foram suspensos a uma concentração final de 200×10^6 /mL com Botucurio® (Botupharma – Botucatu – Ltda/ME, Botucatu, São Paulo, Brasil) com a adição de 1, 50 e 100mM de carnosina, sendo o grupo controle suspenso apenas com Botucurio®. As amostras foram criopreservadas de acordo com protocolo estabelecido por Papa et al. (2014) e no momento da avaliação foram descongeladas a 37°C durante 30 segundos.

3.2.4.2 Congelabilidade

De acordo com a motilidade avaliada pelo Sistema Computadorizado de Análise Espermática após a descongelação, as amostras foram divididas em grupos de alta congelabilidade (AC) quando apresentaram motilidade maior que 30% e baixa congelabilidade (BC) quando apresentaram motilidade menor que 30% (CBRA, 2013).

3.2.4.3 Análise do sêmen descongelado

Após a descongelação, as amostras seminais foram avaliadas pelo sistema computadorizado de análise espermática e pelos testes de integridade de membranas plasmática (PI-Iodeto de Propídio) e acrossomal (FITC-PSA- *Pisum sativum* conjugada a Isotiocinato de fluoresceína) e potencial de membrana mitocondrial (JC-1, iodeto de 5, 5, 6, 6' tetracloro 1, 1, 3, 3' tetraetilbenzimidazolilcarbocianina) pelo citômetro de fluxo BD FACSCalibur (Becton Dickinson, East Rutherford, NJ, USA) do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, utilizando-se o software de aquisição Cell Quest Pro (BD Biosciences). A suscetibilidade da cromatina à denaturação ácida (SCSA) e a produção de EROs (CellRox[®] *green*) foram analisadas utilizando o citômetro de fluxo Guava EasyCyte[™] Mini System (Guava Technologies) do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Além disso, foi avaliada a suscetibilidade do espermatozoide à peroxidação lipídica (ensaio TBARS) e atividade mitocondrial (3'3 diaminobenzidina).

3.2.4.3.1 Sistema computadorizado de análise espermática (CASA - Computer Assisted Sperm Analysis; Hamilton-Thorne)

Os parâmetros de cinética espermática foram analisados pelo Sistema Computadorizado de Análise Espermática (CASA - *Computer Assisted Sperm Analysis*; Hamilton Thorne IVOS 12.3, USA) logo após a descongelação das amostras. Seis μL de cada amostra espermática foram inseridos em uma câmara de contagem Leja previamente aquecida a 37°C e cinco campos foram selecionados aleatoriamente. Foram analisados parâmetros de motilidade espermática total (motilidade, %), motilidade espermática progressiva (progressivos, %), velocidade média de percurso (VAP, $\mu\text{/s}$), velocidade retilínea (VSL, $\mu\text{/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{/s}$), amplitude do movimento lateral da cabeça (ALH, μm), frequência de batimento cruzado (BCF, Hz), retilinearidade ($\text{STR} = \text{VSL}/\text{VCL}$, %) e linearidade ($\text{LIN} = \text{VSL}/\text{VCL}$, %) (NICHI, 2009; HAMILTON et al., 2016). Adicionalmente, os espermatozoides foram divididos em quatro grupos baseando-se na velocidade de movimento, que consistiu: rápidos ($\text{VAP} > 50 \mu\text{/s}$; %), médios ($20 \mu\text{/s} < \text{VAP} < 50 \mu\text{/s}$; %) e espermatozoides imóveis (%) (ALBRIZIO et al., 2010). O *setup* do CASA utilizado neste experimento está descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Parâmetros avaliados pelo sistema computadorizado de análises espermáticas (CASA)
Computer Assisted Sperm Analysis – São Paulo – 2017

Características	Ajuste
Número de imagens adquiridas	40
Taxa de aquisição das imagens	60 Hz
Contraste mínimo da célula	80 pixels
Tamanho mínimo da célula	3 pixels
Contraste para células imóveis	5 pixels
Intensidade para células imóveis	110
Limite para velocidade média de percurso	50 μ /s
Limite para índice retilíneo	75%
Referência de VAP para células lentas	20 μ /s
Referência de VSL para células lentas	0,0 μ /s
Limite superior de tamanho da célula	2,99
Limite inferior de tamanho da célula	0,59
Limite superior de intensidade estática da célula	1,74
Limite inferior de intensidade estática da célula	0,68
Limite superior de alongamento da célula	97%
Limite inferior de alongamento da célula	12%
Temperatura	37°C

3.2.4.3.2 *Testes morfo-funcionais*

3.2.4.3.2.1 *Integridade de membrana plasmática e acrossomal*

Para avaliar a integridade de membrana plasmática utilizou-se a sonda fluorescente Iodeto de Propídio (PI, 6 μ M diluído em 200 μ L de TALP) e para a avaliação da integridade acrossomal, utilizou-se 5 μ L da fluorescência FITC-PSA (100 μ g/mL diluído em 1995 μ L de Azida Sódica 1%, G7462, Promega). Foram adicionados 11,2 μ L de PI (6 μ M) na solução de

FITC-PSA em Azida Sódica 1%. Posteriormente, 200.000 espermatozoides diluídos em 37,5µL de TALP, foram incubados a 37°C, durante 5 minutos, em 13µL da solução de FITC-PI. Para leitura foram adicionados 300µL de TALP (utilizou-se excitação e detecção de 495nm-519nm para FITC; e 493nm-636nm para PI). Esse processo foi realizado para obter um resultado combinado entre integridade de membranas plasmática e acrossomal da mesma população de células. A população de espermatozoides foi definida em citograma de tamanho por complexidade (FSCxSSC). Uma amostra sem qualquer marcação foi aplicada como branco, de maneira a definir os parâmetros de voltagem e limites de negatividade. Em seguida, uma amostra marcada apenas com FITC-PSA, cuja emissão corresponde à faixa do detector verde (FL1), foi utilizada para definir parâmetros de positividade no canal FL1 e de compensação. A compensação exclui o percentual de fluorescência verde que invade o canal vizinho, FL2. A mesma amostra foi marcada apenas com PI, avaliando positividade em FL2 (amarelo/laranja) e compensação em FL1. Após a configuração do instrumento, foram analisadas as amostras com dupla marcação (FITC e PI). Novamente os espermatozoides foram definidos em gráficos de tamanho por complexidade (FSCxSSC) e então analisados quanto à fluorescência em FL1xFL2. Populações de células duplamente negativas foram consideradas como viáveis (AIMI, indicando acrossomo íntegro e membrana plasmática íntegra); positivas apenas em verde (ALMI, indicando acrossomo lesionado e membrana plasmática íntegra); positivas apenas em vermelho (AIML, indicando acrossomo íntegro e membrana plasmática lesionada); duplamente positivas (ALML, indicando acrossomo e membrana plasmática lesionados). O percentual de cada uma destas populações em relação à população total de espermatozoides foi requisitado ao *software* FlowJo (Treestar, Inc.) e exportado para uma planilha de Microsoft Excel.

3.2.4.3.2.2 *Potencial de membrana mitocondrial*

O potencial de membrana mitocondrial foi determinado com a adição de 1µL de JC-1 (50µg/mL, Invitrogen, Eugene, OR, USA) em 200.000 espermatozoides diluídos em 37,5µL de TALP. Após incubação a 37°C, durante 5 minutos, 300µL de TALP foram adicionados para leitura. A sonda JC-1 possui dupla emissão, dependendo do grau de atividade mitocondrial. Ao microscópio de fluorescência, a cor verde indica baixa atividade, enquanto a laranja alta atividade. No entanto no citômetro de fluxo não é possível distinguir populações de cores diferentes isoladamente. Nos citogramas de FL1xFL2, a população corada com JC-1 é 100% duplo positiva, se mantendo em níveis basicamente iguais de fluorescência em FL1 (verde) e

forma subgrupos com níveis variados de atividade mitocondrial em FL2, com diferentes intensidades de brilho laranja neste canal. Foram salvos 7000 eventos, considerando apenas a população definida como espermatozoides. Os arquivos salvos foram analisados em *software* FlowJo (Treestar, Inc.). A partir da população de espermatozoides foi definida a intensidade de cor no canal FL2, solicitando ao programa a média geométrica de fluorescência (MFI) neste canal. A MFI é calculada considerando o número de células correspondentes a cada valor arbitrário de fluorescência atribuído às mesmas pelo citômetro. Este valor de MFI foi exportado para posterior análise do potencial de membrana mitocondrial. A leitura foi realizada com excitação de 515nm e detecção de 529nm (verde) e 590nm (vermelha).

3.2.4.3.2.3 *Integridade de DNA*

O ensaio da estrutura da cromatina espermática (SCSA) adaptado do protocolo descrito por (BOE-HANSEN et al.) é uma técnica que determina quantitativamente a integridade da cromatina espermática, definida pela suscetibilidade do DNA à denaturação ácido-induzida “in situ”. Foram adicionadas 200.000 células em 50µL de tampão TNE (Tris-HCl 0,01M, NaCl 0,15M, EDTA 1mM e água destilada, pH 7,4) e 100µL de detergente ácido (HCl 0,08M, NaCl 0,15M e Triton X-100 0,1% em água destilada, pH 1,2). Após incubação a 37°C, durante 30 segundos, foram adicionados 300µL de solução de Laranja de Acridina (ácido cítrico 0,1M, Na₂HPO₄ 0,2M, EDTA 0,001M, NaCl 0,15M e solução estoque de Laranja de Acridina 6µg/mL em água destilada, pH 6). Foi necessário caracterizar o controle negativo da população de células (não suscetíveis à ação do detergente ácido e que emitem fluorescência verde) e o controle positivo (suscetíveis à ação do detergente ácido ou que emitem fluorescência vermelha). Para a caracterização das populações, uma amostra de sêmen foi incubada com peróxido de hidrogênio (30%) na proporção 1:2, respectivamente para realizar o controle positivo; o controle negativo foi definido com uma amostra descongelada e lavada do mesmo animal e mesma partida. Inicialmente, o controle negativo e positivo foram submetidos ao SCSA para obter um pico de cada controle no histograma AlfaTYlog. Após, a amostra formada foi analisada com a mistura dos dois controles em proporções iguais (50%) para obter dois picos. O ponto médio entre os dois picos foi estabelecido como ponto de corte para a consideração das células positivas ou negativas para o SCSA. O AlfaTYlog é o resultado da divisão da fluorescência vermelha pela fluorescência total (vermelho e verde) e é utilizado para quantificar a extensão da denaturação da estrutura da cromatina de cada espermatozoide. A leitura foi realizada com excitação a 488nm e detectada a 630-650nm

(vermelho) e 515-530nm (verde).

3.2.4.3.2.4 *Atividade mitocondrial*

Para avaliar a atividade mitocondrial, utilizamos a técnica citoquímica com o corante 3,3'-diaminobenzidina (ensaio DAB 0,1% em tampão fosfato salino), o qual é oxidado pela enzima citocromo C e forma um complexo marrom depositado em mitocôndrias ativas (HRUDKA, 1987). Para esta técnica, uma alíquota de 20µL de amostra foi incubada na proporção 1:1 com diaminobenzidina (1mg/mL de PBS) em um tubo de microcentrífuga âmbar durante 1 hora a 37°C. Após a incubação, a mistura foi depositada em lâminas de microscopia em local protegido da luz. As lâminas foram fixadas em formol a 10% durante 10 minutos e secas no ar ao abrigo da luz. A leitura das lâminas foi realizada em microscopia com contraste de fase em um aumento de 1000 vezes, sob óleo de imersão, onde foram contadas 100 células. Estas células foram classificadas em quatro classes de acordo com a porcentagem de mitocôndrias ativas: peça intermediária totalmente corada, indicando alta atividade mitocondrial (DAB I), mais de 50% da peça intermediária corada; indicando média atividade mitocondrial (DAB II), menos de 50% da peça intermediária corada; indicando baixa atividade mitocondrial (DAB III) e peça intermediária totalmente descorada, indicando ausência de atividade mitocondrial (DAB IV).

3.2.4.3.2.5 *Status oxidativo*

Para avaliar o *status* oxidativo, foi utilizada uma sonda fluorescente penetrante que quando oxidada por radicais livres intracelulares, liga-se ao DNA e emite maior intensidade de fluorescência verde (CellROX® *green*, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). Nesta técnica, 200.000 células foram incubadas com CellROX® *green*, a 37°C, durante 30 minutos e foi adicionado PI (6µM) nos últimos 10 minutos de incubação. A leitura foi realizada com excitação de 488nm e detectadas a 630-650nm (PI) e 515-530nm (CellROX® *green*) (DE CASTRO et al., 2015). Os dados foram analisados a partir da população de célula com: estresse oxidativo positivo e membrana íntegra (EOx⁺MI).

A suscetibilidade do espermatozoide ao estresse oxidativo foi avaliada pelo ensaio TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico), de acordo com a metodologia de Nichi et al. (2006), adaptado de Ohkawa; Ohishi; Yagi (1979). A peroxidação lipídica foi induzida nas amostras pela incubação de 200µL de sêmen com 50µL de ácido ascórbico

(20mM) e 50µL de sulfato de ferro (4mM) em banho seco a 37°C, durante 90 minutos (GOMEZ; IRVINE; AITKEN, 1998). Após a indução, foram adicionados 600µL de ácido tricloroacético 10% gelado. As amostras foram centrifugadas a 20800xg, durante 15 minutos (5°C) para precipitação de proteínas e debris. Em criotubos, foram recuperadas alíquotas de 800µL do sobrenadante. Foram adicionados 800µL de ácido tiobarbitúrico 1% e incubadas a 95°C em banho-maria, durante 15 minutos. Com o estresse oxidativo, o ácido tiobarbitúrico reage com o malondialdeído formando uma coloração rósea. Para quantificar a coloração rósea das amostras foi utilizado um espectrofotômetro (Ultrospec 3300 PRO[®], Amersham Biosciences, EUA) com comprimento de onda de 532 nanômetros. A suscetibilidade dos espermatozoides à peroxidação lipídica foi expressa em nano gramas de TBARS/10⁶ espermatozoides.

3.2.5 Análise estatística

Os dados foram avaliados utilizando o programa SAS System for Windows 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). A análise de interação entre os fatores congelabilidade (alta e baixa) e concentrações de carnosina (controle, 1mM, 50mM e 100mM) foi realizada pelo PROC GLM. O efeito entre os fatores congelabilidade e tratamentos com carnosina foi determinado pelo teste paramétrico LSD (*Least Significant Difference*) e não paramétrico (Wilcoxon), de acordo com a normalidade dos resíduos (distribuição de Gauss) e homogeneidade das variâncias testadas pelo aplicativo *Guided Data Analysis*. Além disso, foram realizados testes de correlação paramétricos (Pearson) e não paramétricos (Spearman). O nível de significância utilizado para rejeitar H₀ (hipótese de nulidade) foi de 5%. Os resultados estão apresentados por médias (média ± erro padrão da média) dos dados originais.

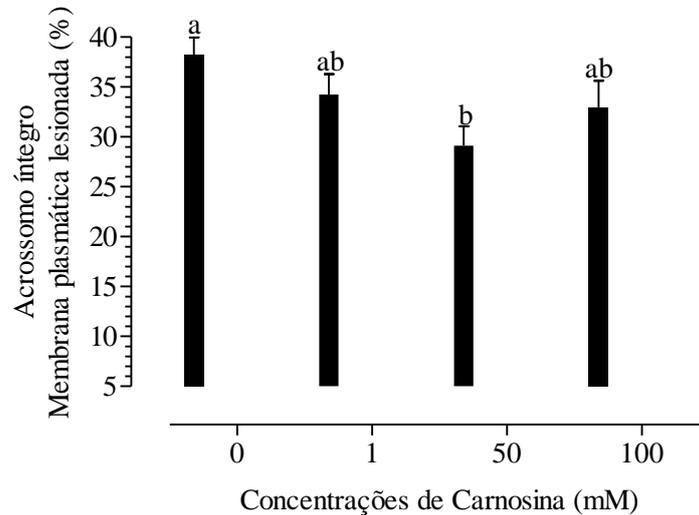
3.3 RESULTADOS

Os resultados referentes ao efeito da congelabilidade (alta e baixa), da carnosina e da interação congelabilidade*carnosina estão descritos na Tabela 3 do material complementar.

Os resultados referentes ao efeito da carnosina em todas as variáveis estão descritos na Tabela 4 do material complementar. Avaliando separadamente o efeito das concentrações de carnosina, independente da congelabilidade, amostras tratadas com 50mM apresentaram menor lesão de membrana plasmática e integridade de acrossomo (Figura 3), e a maior concentração de carnosina (100mM) promoveu um aumento na amplitude do deslocamento

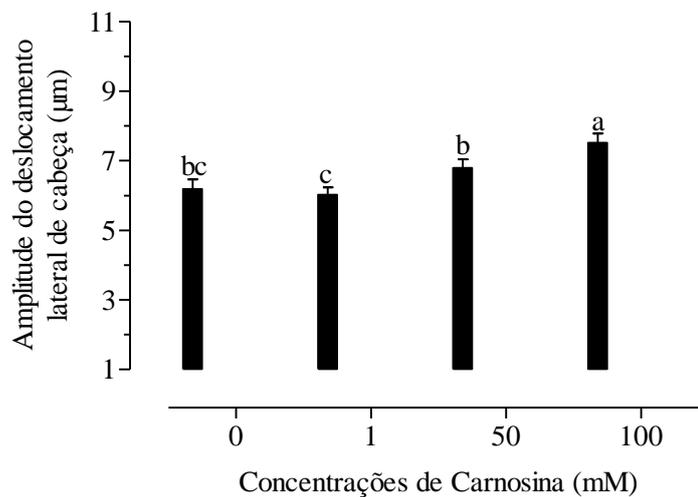
lateral de cabeça (Figura 4).

Figura 3 - Efeito das diferentes concentrações de carnosina nas células com acrossomo íntegro e membrana plasmática lesionada (AIML, %) em amostras criopreservadas de equinos – São Paulo – 2017



a,b, c: letras diferentes indicam diferença estatística entre tratamentos

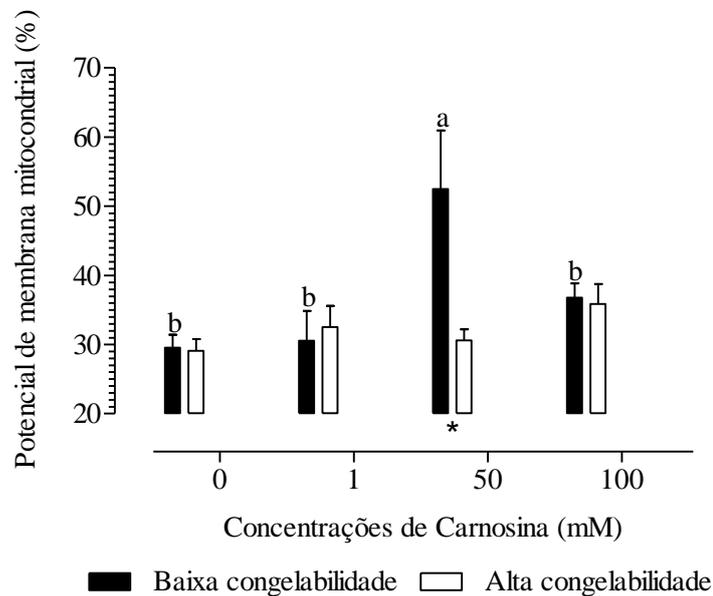
Figura 4 - Efeito das diferentes concentrações de carnosina na amplitude do deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm) em amostras criopreservadas de equinos – São Paulo – 2017



a,b, c: letras diferentes indicam diferença estatística entre tratamentos

Em relação às amostras de baixa congelabilidade criopreservadas com 50mM de carnosina, observamos maior potencial de membrana mitocondrial e uma correlação positiva com lesão de membrana plasmática e acrossomo ($r=0,45$; $p=0,04$), fato que não foi observado em amostras de alta congelabilidade (Figura 5).

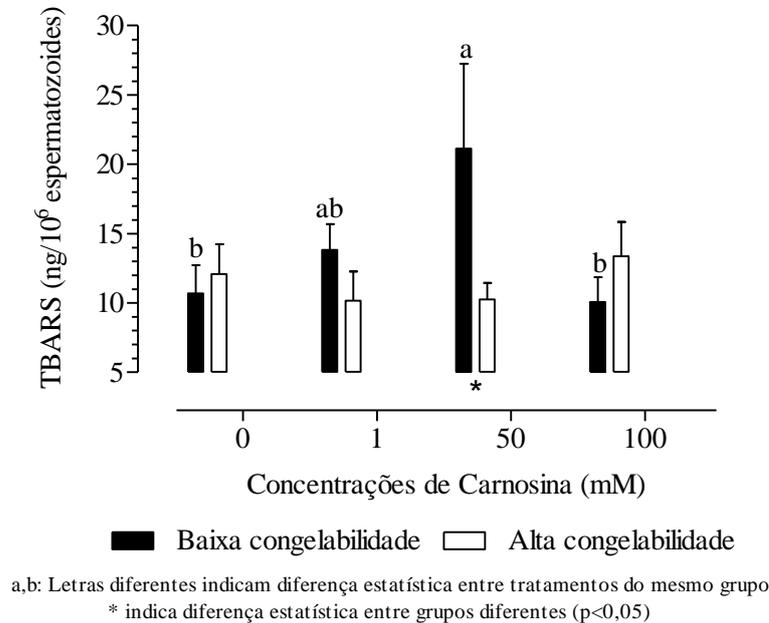
Figura 5 - Efeito das diferentes concentrações de carnosina no potencial de membrana mitocondrial (%) de amostras criopreservadas de equinos com alta e baixa congelabilidade – São Paulo – 2017



a,b: Letras diferentes indicam diferença estatística entre tratamentos do mesmo grupo
 * indica diferença estatística entre grupos diferentes ($p < 0,05$)

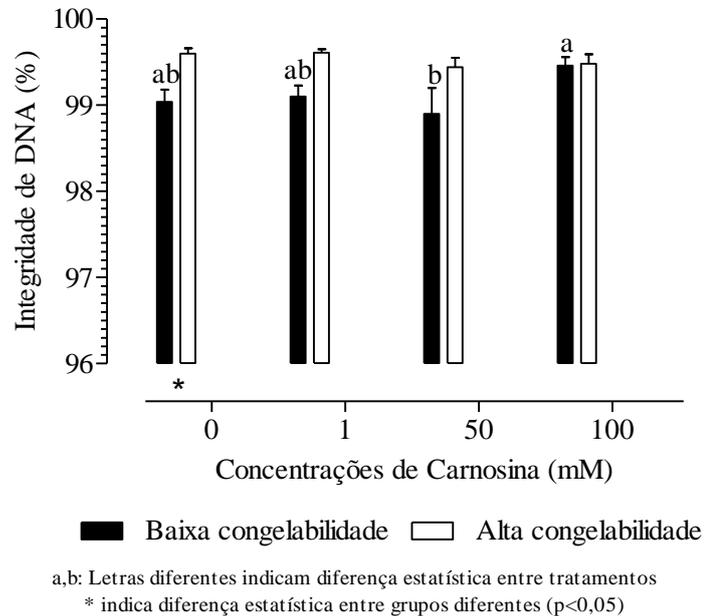
A maior suscetibilidade do espermatozoide ao estresse oxidativo foi encontrada em amostras de baixa congelabilidade criopreservadas com 50mM, comparando com o grupo controle e com amostras de alta congelabilidade (Figura 6). Observamos também uma correlação negativa entre a suscetibilidade do espermatozoide ao estresse oxidativo e integridade de membrana plasmática, acrossomal ($r = -0,50$; $p = 0,01$) e DNA ($r = -0,49$; $p = 0,02$).

Figura 6 - Efeito das diferentes concentrações de carnosina na suscetibilidade do espermatozoide ao estresse oxidativo (ng/10⁶sptz) de amostras criopreservadas de equinos com alta e baixa congelabilidade – São Paulo – 2017



Amostras controle de baixa congelabilidade apresentaram menor integridade de DNA quando comparadas às amostras controle de alta congelabilidade. No entanto, quando tratadas com 100mM de carnosina, houve um aumento na porcentagem de células com DNA íntegro em amostras de baixa congelabilidade, não diferindo das amostras com alta congelabilidade (Figura 7). Ainda, observamos uma correlação positiva entre integridade de DNA e de membrana plasmática e acrossomo ($r=0,53$; $p=0,01$) e; uma correlação negativa entre alta atividade mitocondrial e uma diminuição do escore calculado do potencial de membrana mitocondrial ($r=-0,53$; $p=0,01$), fato que não foi observado em amostras de alta congelabilidade.

Figura 7 - Efeito das diferentes concentrações de carnosina na integridade de DNA (%) de amostras criopreservadas de equinos com alta e baixa congelabilidade – São Paulo – 2017



3.4 DISCUSSÃO

A carnosina apresenta atividade antioxidante mediada pela neutralização de íons metálicos, proteção contra injúrias causadas por espécies reativas de oxigênio e pelo radical hidroxil (BOLDYREV; ALDINI; DERAIVE, 2013). Além disso, protege contra danos induzidos pelo malondialdeído (BURCHAM et al., 2002), subproduto do estresse oxidativo com alta capacidade deletéria para espermatozoides equinos na ausência do plasma seminal (KAWAI et al., 2017). Esse dipeptídeo foi encontrado no sêmen de equinos por Ducci e colaboradores (2005). Porém, o processo de criopreservação requer a retirada quase total do plasma seminal (FERREIRA; MATSUBARA, 1997) e acreditamos que a carnosina pode ser retirada junto com o plasma seminal. Assim, objetivamos avaliar o possível efeito protetor da carnosina na criopreservação espermática de amostras de ganhões com alta e baixa congelabilidade.

Não houve diferença estatística entre os tratamentos de carnosina em amostras de alta congelabilidade. A congelabilidade é definida como a capacidade do espermatozoide de suportar procedimentos de criopreservação; enquanto que a má congelabilidade indica baixa integridade de membrana e motilidade pós-descongelação. A existência da variação de congelabilidade entre indivíduos (ORTIZ et al., 2015) tem sido atribuída à ausência de seleção de ganhões com base em sua capacidade espermática para resistir à criopreservação,

diferentemente do que ocorre em touros (YESTE et al., 2015). Nesse sentido, parece que não houve um desequilíbrio entre a atividade oxidante e antioxidante da célula em amostras de alta congelabilidade. Para que uma suplementação com antioxidantes seja bem sucedida, é necessário que o sistema alvo esteja em estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1985; NICHI, 2009). A produção excessiva de espécies reativas de oxigênio pode ser deletéria para a membrana espermática e integridade de DNA em equinos. Porém, uma concentração ideal é necessária para manter funções fisiológicas como motilidade, capacitação e reação acrossomal (DARR et al., 2016). Assim, uma quantidade exacerbada de antioxidantes pode não apresentar efeitos ou mesmo exercer um efeito inibitório do papel fisiológico das EROs e consequentemente, bloquear eventos importantes da fisiologia espermática e dos processos de fertilização (DE LAMIRANDE et al., 1997; NICHI, et al., 2007). Outro ponto importante em relação à eficiência de uma terapia antioxidante seria qual antioxidante utilizar, uma vez que cada espécie reativa de oxigênio tem seu antioxidante preferencial. No entanto, em estudo prévio (KAWAI et al., 2017) notamos que a carnosina parecia ser o antioxidante ideal uma vez que amostras seminais incubadas com MDA, sem a presença do plasma seminal (como no caso das amostras criopreservadas), apresentaram grande suscetibilidade a danos.

Avaliando separadamente o efeito das concentrações de carnosina, independente da congelabilidade, amostras tratadas com 50mM apresentaram menor lesão de membrana plasmática, possivelmente pela maior estabilidade de membrana conferida pela carnosina. A característica hidrofílica de uma parte da molécula de carnosina permite uma aderência virtual às rupturas da bicamada lipídica causada pela oxidação. Além disso, neutraliza (GARIBALLA; SINCLAIR, 2000) e previne o acúmulo de produtos derivados da peroxidação lipídica de membranas celulares (ABDELKADER et al., 2016). A utilização simultânea de duas ou mais sondas fluorescentes têm sido utilizada para avaliar alterações metabólicas celulares (CELEGHINI et al., 2010). Nesse experimento avaliamos a integridade de membranas plasmática e acrossomal pela junção das sondas FITC-PSA e PI. No entanto, para obter o resultado combinado entre integridade de membranas plasmática e acrossomal da mesma população de células, foi necessário analisar cada sonda separadamente. Dessa forma, considerando a população de células com membrana plasmática e acrossomo íntegros, não houve diferença estatística entre os tratamentos com carnosina.

Apesar da diminuição das células com lesão de membrana, não houve efeito da carnosina para a maioria das variáveis relacionadas à cinética enzimática, com exceção do ALH. Amostras tratadas com 100mM apresentaram maior amplitude do deslocamento lateral da cabeça. Segundo McPartlin (2009) e colaboradores, o movimento da cabeça do

espermatozoide é dependente do padrão do movimento de flagelo, assim, o aumento da amplitude do deslocamento lateral da cabeça com uma diminuição concomitante da linearidade e retilinearidade são característicos da hiperativação. No presente estudo, apesar de não apresentarem diferença estatística, houve uma diminuição numérica da linearidade e retilinearidade.

A hiperativação desempenha um papel na liberação de espermatozoides do epitélio do reservatório do oviduto, auxilia na penetração da zona pelúcida (WISER et al., 2014) e deve ocorrer imediatamente antes da ovulação, pois é considerada essencial na capacitação e fertilização (LEEMANS et al., 2016). A capacitação de espermatozoides está associada à reorganização das membranas devido à redistribuição de fosfolipídios e remoção do colesterol (BAILEY; BILODEAU; CORMIER, 2000). Da mesma forma, o processo de criopreservação promove uma modificação subletal das membranas do espermatozoide tornando-o mais sensível pós-descongelamento (WATSON, 1995). Em estudo conduzido por Dobrinski e colaboradores (1995), verificaram que espermatozoides equinos criopreservados apresentavam menor capacidade de se ligarem a zonas pelúcidas quando comparados com espermatozoides armazenados à temperatura ambiente. Assim, a hiperativação/capacitação precoce produz uma subpopulação de espermatozoides com menor vida útil, reduzindo efetivamente a eficiência de fertilização da população como um todo (BAILEY; BILODEAU; CORMIER, 2000).

Amostras controle de baixa congelabilidade apresentaram maior suscetibilidade da cromatina à denaturação ácida quando comparadas com amostras controle de alta congelabilidade. Porém, quando tratadas com 100mM de carnosina, as amostras de baixa congelabilidade apresentaram a mesma suscetibilidade da cromatina à denaturação ácida que amostras de alta congelabilidade. Apesar de estatisticamente significativa, a diminuição da suscetibilidade da cromatina à denaturação ácida foi menor que 1% em amostras de baixa congelabilidade. Podemos sugerir que esta diferença pode não representar um valor biológico importante, pois de acordo com a avaliação do DNA espermático de garanhões pela mesma técnica utilizada neste estudo, Kenney e colaboradores (1995) relataram que a fertilidade de um garanhão pode estar comprometida quando a fragmentação do DNA atingir 16%. Além disto, em humanos, a subfertilidade ocorre com 28% de comprometimento do DNA quando utilizada esta técnica (EVENSON, 2016).

Apesar dessa proteção parcial, amostras de baixa congelabilidade tornaram-se mais suscetíveis ao estresse oxidativo quando tratadas com 50mM de carnosina. O estresse oxidativo ocorre pelo desequilíbrio entre a produção de EROs e sistemas antioxidantes

(NACHI, et al., 2006). O excesso de EROs desafia os limites intracelulares de defesa antioxidante do espermatozoide, o qual possui pouco citoplasma e altas concentrações de ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) na membrana, tornando mais suscetível (SIKKA, 2004; SILVA; GUERRA, 2010). Quando os fosfolipídios sofrem peroxidação, um dos subprodutos, o malondialdeído (MDA) é utilizado para mensurar danos peroxidativos em espermatozoide (AITKEN et al., 2015) pelas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO et al., 2010; PATRICIO et al., 2016). Neste experimento, avaliamos o nível de TBARS induzido por um sistema gerador de EROs em amostras espermáticas criopreservadas para verificar a suscetibilidade dos espermatozoides frente a uma situação hipotética de estresse oxidativo intenso (RODRIGUES et al., 2015). Observamos uma correlação negativa entre a suscetibilidade do espermatozoide ao estresse oxidativo e integridade de membrana plasmática, acrossomo e DNA. Isso ocorreu possivelmente pelo fato do MDA ser mutagênico, genotóxico e por promover alterações nas membranas (WRIGHT; MILNE; LEESON, 2014).

Em estudos anteriores, verificamos uma variação na suscetibilidade da célula espermática às diferentes EROs dependendo da espécie animal envolvida. A identificação da espécie reativa mais deletéria para determinada espécie é essencial para eficiência de um tratamento antioxidante, pois cada antioxidante atua em um determinado agente pró-oxidativo (NORDBERG; ARNÉR, 2001). No entanto, é necessário que o sistema alvo esteja em estresse oxidativo ou sob ação de uma quantidade de EROs que desafie a capacidade antioxidante do sistema (HALLIWELL, BARRY; GUTTERIDGE, 1985; NACHI, 2009). Além disso, a quantidade exacerbada de antioxidantes pode inibir funções fisiológicas das EROs e consequentemente bloquear eventos importantes da fisiologia espermática e dos processos de fertilização. Assim, o estudo adequado do tipo de antioxidante e da sua respectiva dose é essencial (DE LAMIRANDE et al., 1997; NACHI et al., 2007). Baseando-se nos resultados do presente estudo, e em trabalho anterior no qual o MDA parece ser extremamente deletério ao espermatozoide equino na ausência do plasma seminal (KAWAI et al., 2017), o antioxidante ideal para a proteção do sêmen de garanhões durante a criopreservação parece ser de fato, a carnosina. Além disto, a dose de 50mM de carnosina parece ser muito próxima da ideal. No entanto, mais estudos são necessários para determinar as causas da maior suscetibilidade ao estresse oxidativo induzido.

Um dos fatores que pode explicar essa suscetibilidade ao estresse oxidativo é a influência negativa do tratamento com carnosina sobre a mitocôndria, a qual pode influenciar na produção de ATP pela via glicolítica (OPPERMANN et al., 2016). A glicólise é a via

predominante pela qual a glicose, principal fonte de carbono celular é capaz de suprir intermediários metabólicos que são os materiais primários necessários para as reações biosintéticas. A partir da glicose as células podem obter os esqueletos carbônicos para cada um dos seus aminoácidos, nucleotídeos, coenzimas, ácidos graxos e outros intermediários metabólicos necessários para o seu crescimento e multiplicação (HIPKISS; GAUNITZ, 2014). Gaunitz e colaboradores (2010a; 2010b) estudaram a influência da carnosina em cultivo de células de tumor cerebral e descobriram que a adição deste dipeptídeo inibiu o crescimento celular devido ao declínio na síntese de ATP da via glicolítica. Da mesma forma, Hipkiss e colaboradores (2013) estudaram um modelo para células tumorais e concluíram que a carnosina pode influenciar negativamente na glicólise. O cultivo de levedura com apenas uma fonte de carbono, a glicose, recebeu carnosina e causou até 20% de morte celular e diminuição da taxa de crescimento. Por outro lado, células que cresceram aerobiamente em glicerol como única fonte de carbono não foram inibidas pela carnosina e apresentaram maior taxa de crescimento. Isto sugere que a carnosina inibe a glicólise antes da formação da diidroxiacetona fosfato (DHAP) e gliceraldeído-3-fosfato (G3P), pois o glicerol é normalmente metabolizado via DHAP e G3P. Ademais, muitos estudos têm relacionado disfunção mitocondrial com a produção de oxidantes que podem causar infertilidade (CASSINA et al., 2015) ou algumas doenças como Parkinson (HAUSER; HASTINGS, 2013; RYAN et al., 2015) e esclerose múltipla (WITTE et al., 2014).

De fato, observamos um aumento no escore calculado do potencial de membrana mitocondrial em amostras de baixa congelabilidade tratadas com 50mM de carnosina. Apesar de aparentemente ser um efeito positivo, esse score apresenta uma correlação positiva com lesão de membrana plasmática e acrossomo e ainda, observamos uma correlação negativa entre alta atividade mitocondrial e uma diminuição do escore calculado do potencial de membrana mitocondrial, fato que não foi observado em amostras de alta congelabilidade. Com a inibição parcial da via glicolítica, a produção do piruvato essencial para o ciclo de Krebs diminui e afeta indiretamente a fosforilação oxidativa (LOSANO et al., 2017). A glicólise e o ciclo de Krebs produzem transportadores de elétrons que atuam na fosforilação oxidativa. Com a deficiência do piruvato, ocorre uma disfunção mitocondrial que pode ser observada na diminuição do potencial mitocondrial e por um mecanismo compensatório, a mitocôndria aumenta o transporte de elétrons na cadeia respiratória para tentar evitar uma despolarização da membrana e manter o potencial de membrana mitocondrial (LOSANO et al., 2017). Além disso, como a carnosina é descrita por inibir a glicólise antes da formação da diidroxiacetona fosfato (DHAP) e gliceraldeído-3-fosfato (G3P) (HIPKISS et al., 2013), a via

das pentoses também pode ser inibida. Esta via apresenta um papel importante na prevenção do estresse oxidativo e peroxidação lipídica pela produção de NADPH e ribose-5-fosfato. O NADPH atua como um doador de próton no sistema antioxidante glutationala-peroxidase/glutationala-redutase, onde a glutationala reduzida é utilizada como um substrato para degradar peróxido de hidrogênio em água pela glutationala peroxidase e se transforma em glutationala oxidada. Esta por sua vez, precisa ser reduzida em glutationala reduzida pela glutationala redutase para continuar este ciclo (PERL et al., 2011).

As duas principais vias de obtenção de energia para o espermatozoide é a via glicolítica e a fosforilação oxidativa. Enzimas associadas à glicólise localizam-se na parte principal da cauda e a fosforilação oxidativa ocorre nas cristas mitocondriais na peça intermediária do espermatozoide (NELSON; LEHNINGER; COX, 2008). Moléculas grandes como a glicose não podem atravessar membranas facilmente, precisam ligar-se a proteínas chamadas transportadoras de glicose (GLUTs). Em espermatozoides equinos, essas proteínas estão localizadas na cauda e no acrossomo, sugerindo que a via glicolítica está envolvida na produção de energia para que modificações de membrana possam ocorrer durante os processos de capacitação e reação acrossomal (VARNER; GIBB; AITKEN, 2015). A distribuição das GLUTs pode sofrer alterações durante a capacitação para prover energia necessária para modificações nas membranas ou hiperativação. No entanto, isso não ocorre em espermatozoides equinos, indicando que espécies que dependem da fosforilação oxidativa a glicólise não é necessária na produção de ATP para manutenção da motilidade, capacitação ou reação acrossomal (GIBB; AITKEN, 2016). Dessa forma, a carnosina pode ser responsável pela diminuição de intermediários da glicólise, redução da produção de piruvato (estimulante mitocondrial) pela glicólise e, portanto, diminuição da geração de ATP. Neste caso, a produção de ATP pode estar limitada ao ciclo do ácido cítrico, mecanismo muito menos eficiente. Dessa forma, uma alternativa para os efeitos colaterais deletérios do uso terapêutico da carnosina, especialmente relacionados a problemas na mitocôndria e consequente desequilíbrio na homeostase oxidativa, seria a combinação com piruvato, para compensar a diminuição da produção desta substância pela glicólise (HIPKISS; GAUNITZ, 2014).

O tratamento com carnosina em espermatozoides de alta congelabilidade não apresenta benefícios. Por sua vez, quando empregada em espermatozoides de baixa congelabilidade, esta terapia, na dose de 50mM, leva a uma melhoria parcial de membrana plasmática e DNA. No entanto, leva a um possível comprometimento mitocondrial e consequente aumento da suscetibilidade à peroxidação lipídica. Mais estudos são necessários para verificar o mecanismo de ação da carnosina no sêmen de garanhões maus congeladores.

REFERÊNCIAS

- ABDELKADER, H.; LONGMAN, M. R.; ALANY, R. G.; PIERSCIONEK, B. Phytosome-hyaluronic acid systems for ocular delivery of L-carnosine. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, n., p. 2815, 2016.
- AITKEN, R. J.; GIBB, Z.; BAKER, M. A.; DREVET, J.; GHARAGOZLOO, P. Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 2, p. 1-10, 2015.
- ALBRIZIO, M.; LACALANDRA, G. M.; MICERA, E.; GUARICCI, A. C.; NICASSIO, M.; ZARRILLI, A. Delta opioid receptor on equine sperm cells: subcellular localization and involvement in sperm motility analyzed by computer assisted sperm analyzer (CASA). **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 8, n. 1, p. 78, 2010.
- AVANZI, B. R.; RAMOS, R. S.; NICHI, M.; FIORATTI, E. G.; DELL'AQUA JÚNIOR, J. A.; WECHSTER, F. S.; PAPA, F. O. Avaliação da cinética espermática, integridade de membrana plasmática e resistência ao estresse oxidativo no sêmen equino congelado com diferentes concentrações espermáticas. **Veterinária e Zootecnia**, v., n., p. 226-238, 2011.
- BAILEY, J. L.; BILODEAU, J.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 1, p. 1-7, 2000.
- BOE-HANSEN, G. B.; MORRIS, I. D.; ERSBØLL, A. K.; GREVE, T.; CHRISTENSEN, P. DNA integrity in sexed bull sperm assessed by neutral Comet assay and sperm chromatin structure assay. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1789-1802.
- BOLDYREV, A. A.; ALDINI, G.; DERAIVE, W. Physiology and pathophysiology of carnosine. **Physiological reviews**, v. 93, n. 4, p. 1803-1845, 2013.
- BONNES-TAOUREL, D.; GUÉRIN, M.-C.; TORREILLES, J. Is malonaldehyde a valuable indicator of lipid peroxidation? **Biochemical pharmacology**, v. 44, n. 5, p. 985-988, 1992.
- BRANHAM, M. L.; SINGH, P.; BISETTY, K.; SABELA, M.; GOVENDER, T. Preparation, spectrochemical, and computational analysis of L-carnosine (2-[(3-aminopropanoyl) amino]-3-(1H-imidazol-5-yl) propanoic acid) and its ruthenium (II) coordination complexes in aqueous solution. **Molecules**, v. 16, n. 12, p. 10269-10291, 2011.
- BURCHAM, P. C.; KAMINSKAS, L. M.; FONTAINE, F. R.; PETERSEN, D. R.; PYKE, S. M. Aldehyde-sequestering drugs: tools for studying protein damage by lipid peroxidation products. **Toxicology**, v. 181, n., p. 229-236, 2002.
- CASSINA, A.; SILVEIRA, P.; CANTU, L.; MONTES, J. M.; RADI, R.; SAPIRO, R. Defective Human Sperm Cells Are Associated with Mitochondrial Dysfunction and Oxidant Production. **Biology of reproduction**, v. 93, n. 5, p. Article 119, 111-110, 2015.
- CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal 2013.

CELEGHINI, E. C. C.; ANDRADE, A. F. C. D.; RAPHAEL, C. F.; NASCIMENTO, J.; TICIANELLI, J. S.; ARRUDA, R. P. D. Damage assessment of the equine sperm membranes by fluorimetric technique. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n., p. 1285-1292, 2010.

CHENG, J.; WANG, F.; YU, D.-F.; WU, P.-F.; CHEN, J.-G. The cytotoxic mechanism of malondialdehyde and protective effect of carnosine via protein cross-linking/mitochondrial dysfunction/reactive oxygen species/MAPK pathway in neurons. **European journal of pharmacology**, v. 650, n. 1, p. 184-194, 2011.

DARR, C. R.; CORTOPASSI, G. A.; DATTA, S.; VARNER, D. D.; MEYERS, S. A. Mitochondrial oxygen consumption is a unique indicator of stallion spermatozoal health and varies with cryopreservation media. **Theriogenology**, v. 86, n. 5, p. 1382-1392, 2016.

DE ALMEIDA, F. Q.; SILVA, V. P. Progresso científico em equideocultura na 1a década do século XXI. **Oceania**, v. 411, n. 9.000, p. 420.956, 2010.

DE CASTRO, L. S.; DE ASSIS, P. M.; SIQUEIRA, A. F.; HAMILTON, T. R.; MENDES, C. M.; LOSANO, J. D.; NICHI, M.; VISINTIN, J. A.; ASSUMPÇÃO, M. E. Sperm Oxidative Stress Is Detrimental to Embryo Development: A Dose-Dependent Study Model and a New and More Sensitive Oxidative Status Evaluation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, n., p., 2015.

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

DI PIERRO, F.; BERTUCCIOLI, A.; BRESSAN, A.; RAPACIOLI, G. Carnosine-based supplement. **Nutrafoods**, v. 10, n. 2-3, p. 43-47, 2011.

DOBRINSKI, I. N. A.; THOMAS, P. G. A.; BALL, B. A. Cryopreservation Reduces the Ability of Equine Spermatozoa to Attach to Oviductal Epithelial Cells and Zonae Pellucidae In Vitro. **Journal of Andrology**, v. 16, n. 6, p. 536-542, 1995.

DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, Á.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; DEL OLMO, E.; BISBAL, A.; ROS-SANTAELLA, J. L.; GARDE, J. J. Comparison of the TBARS Assay and BODIPY C11 Probes for Assessing Lipid Peroxidation in Red Deer Spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 6, p. e360-e368, 2010.

DUCCI, M.; PACCHINI, S.; NICCOLINI, A.; VIALE, A.; GAZZANO, A.; MARTELLI, F.; GADEA, J. Poster Abstracts - Quantitative Determination of Imidazole Dipeptides in Stallion Spermatozoa and Seminal Plasma. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, n. 4, p. 379-379, 2005.

DUCCI, M.; PACCHINI, S.; NICCOLINI, A.; GAZZANO, A.; CERRI, D.; GADEA, J.; BOBOWIEC, R.; SIGHIERI, C.; MARTELLI, F. Concentrations of carnosine, anserine, L-histidine and 3-methyl histidine in boar spermatozoa and sheep milk by a modified HPLC method. **Polish journal of veterinary sciences**, v. 9, n. 3, p. 159-163, 2006.

DUNNETT, M.; HARRIS, R. C.; DUNNETT, C. E.; HARRIS, P. A. Plasma carnosine concentration: diurnal variation and effects of age, exercise and muscle damage. **Equine**

Veterinary Journal, v. 34, n. S34, p. 283-287, 2002.

EVENSON, D. P. The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA[®]) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility. **Animal Reproduction Science**, v. 169, n., p. 56-75, 2016.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n., p. 61-68, 1997.

GARIBALLA, S. E.; SINCLAIR, A. J. Carnosine: physiological properties and therapeutic potential. **Age and Ageing**, v. 29, n. 3, p. 207-210, 2000.

GIBB, Z.; AITKEN, R. J. The Impact of Sperm Metabolism during In Vitro Storage: The Stallion as a Model. **BioMed Research International**, v. 2016, n., p. 8, 2016.

GOMEZ, E.; IRVINE, D.; AITKEN, R. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxy-alkenals in human spermatozoa: Relationships with semen quality and sperm function. **International journal of andrology**, v. 21, n. 2, p. 81-94, 1998.

GUIOTTO, A.; RUZZA, P.; BABIZHAYEV, M. A.; CALDERAN, A. Malondialdehyde scavenging and aldose-derived Schiff bases' transglycation properties of synthetic histidyl-hydrazide carnosine analogs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 18, p. 6158-6163, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. **Free radicals in biology and medicine**: secondary title: Pergamon, 1985.

HAMILTON, T. R. D. S.; MENDES, C. M.; CASTRO, L. S. D.; ASSIS, P. M. D.; SIQUEIRA, A. F. P.; DELGADO, J. D. C.; GOISSIS, M. D.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. Á.; NICHI, M.; VISINTIN, J. A.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. D. Á. Evaluation of Lasting Effects of Heat Stress on Sperm Profile and Oxidative Status of Ram Semen and Epididymal Sperm. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, n., p. 12, 2016.

HAUSER, D. N.; HASTINGS, T. G. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in Parkinson's disease and monogenic parkinsonism. **Neurobiology of Disease**, v. 51, n., p. 35-42, 2013.

HIPKISS, A. R.; PRESTON, J. E.; HIMSWORTH, D. T.; WORTHINGTON, V. C.; ABBOT, N. J. Protective effects of carnosine against malondialdehyde-induced toxicity towards cultured rat brain endothelial cells. **Neuroscience letters**, v. 238, n. 3, p. 135-138, 1997.

HIPKISS, A. R.; WORTHINGTON, V. C.; HIMSWORTH, D. T. J.; HERWIG, W. Protective effects of carnosine against protein modification mediated by malondialdehyde and hypochlorite. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1380, n. 1, p. 46-54, 1998.

HIPKISS, A. R. Carnosine, a protective, anti-ageing peptide? **The International Journal of**

Biochemistry & Cell Biology, v. 30, n. 8, p. 863-868, 1998.

HIPKISS, A. R.; CARTWRIGHT, S. P.; BROMLEY, C.; GROSS, S. R.; BILL, R. M. Carnosine: can understanding its actions on energy metabolism and protein homeostasis inform its therapeutic potential? **Chemistry Central Journal**, v. 7, n. 1, p. 38, 2013.

HIPKISS, A. R.; GAUNITZ, F. Inhibition of tumour cell growth by carnosine: some possible mechanisms. **Amino Acids**, v. 46, n. 2, p. 327-337, 2014.

HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. **International Journal of Andrology**, v. 10, n. 6, p. 809-828, 1987.

JONES, R. Comparative biochemistry of mammalian epididymal plasma. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, v. 61, n. 3, p. 365-370, 1978.

KENNEY, R.; EVENSON, D.; GARCIA, M.; LOVE, C. Relationships between sperm chromatin structure, motility, and morphology of ejaculated sperm and seasonal pregnancy rate. 1995 Society for the Study of Reproduction, p.

KAWAI, G.; GURGEL, J.; LOSANO, J.; DALMAZZO, A.; ROCHA, C.; TSUNODA, R.; GÓES, P.; RUI, B.; ANGRIMANI, D.; ASSUMPÇÃO, M. Susceptibility of stallion spermatozoa to different oxidative challenges: role of seminal plasma. *Journal of Equine Veterinary Science*, v., n., p., 2017.

LEEMANS, B.; GADELLA, B. M.; STOUT, T. A. E.; DE SCHAUWER, C.; NELIS, H.; HOOGEWIJS, M.; VAN SOOM, A. The Role of Oviductal Cells in Activating Stallion Spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 43, Supplement, n., p. S49-S55, 2016.

LIMA, R. A. D. S.; CINTRA, A. G. **Revisão do estudo do complexo do agronegócio do cavalo**. Brasília: Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil, 2016.

LOSANO, J. D. A.; ANGRIMANI, D. S. R.; DALMAZZO, A.; RUI, B. R.; BRITO, M. M.; MENDES, C. M.; KAWAI, G. K. V.; VANNUCCHI, C. I.; ASSUMPÇÃO, M.; BARNABE, V. H.; NICHI, M. Effect of mitochondrial uncoupling and glycolysis inhibition on ram sperm functionality. **Reproduction in Domestic Animals**, v., n., p. n/a-n/a, 2017.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, n., p. 164-175, 2014.

MCPARTLIN, L.; SUAREZ, S.; CZAYA, C.; HINRICHS, K.; BEDFORD-GUAUS, S. Hyperactivation of Stallion Sperm Is Required for Successful In Vitro Fertilization of Equine Oocytes 1. **Biology of reproduction**, v. 81, n. 1, p. 199-206, 2009.

NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.; ANDRADE, A.; ALONSO, M.; CELEGHINI, E.; ARRUDA, R. Effects of sperm concentration and straw volume on motion characteristics and plasma, acrosomal, and mitochondrial membranes of equine cryopreserved spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, n. 6, p. 351-358, 2008.

NELSON, D. L.; LEHNINGER, A. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**: Macmillan, 2008.

NICHI, M.; BOLS, P. E. J.; ZÜGE, R. M.; BARNABE, V. H.; GOOVAERTS, I. G. F.; BARNABE, R. C.; CORTADA, C. N. M. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. **Theriogenology**, v. 66, n. 4, p. 822-828, 2006.

NICHI, M.; GOOVAERTS, I.; CORTADA, C.; BARNABE, V.; DE CLERCQ, J.; BOLS, P. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 C. **Theriogenology**, v. 67, n. 2, p. 334-340, 2007.

NICHI, M. **Efeito do tratamento com antioxidantes e ácidos graxos poli-insaturados em amostras espermáticas epididimárias de touros**. Universidade de São Paulo, 2009.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

OPPERMANN, H.; SCHNABEL, L.; MEIXENSBERGER, J.; GAUNITZ, F. Pyruvate attenuates the anti-neoplastic effect of carnosine independently from oxidative phosphorylation. **Oncotarget**, v., n., p., 2016.

ORTIZ, I.; DORADO, J.; ACHA, D.; GÁLVEZ, M.; URBANO, M.; HIDALGO, M. Colloid single-layer centrifugation improves post-thaw donkey (*Equus asinus*) sperm quality and is related to ejaculate freezability. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 27, n. 2, p. 332-340, 2015.

PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A.; DELL'AQUA JUNIOR, J. A.; MONTEIRO, G. A.; SANCLER-SILVA, Y. F. R.; NETO, C. R. **Manual de Andrologia e Manipulação de Sêmen Equino**: secondary title: Botucatu, 2014.

PATRICIO, A.; CRUZ, D. F.; SILVA, J. V.; PADRÃO, A.; CORREIA, B. R.; KORRODI-GREGÓRIO, L.; FERREIRA, R.; MAIA, N.; ALMEIDA, S.; LOURENÇO, J.; SILVA, V.; FARDILHA, M. Relation between seminal quality and oxidative balance in sperm cells. **Acta Urológica Portuguesa**, v. 33, n. 1, p. 6-15, 2016.

PERL, A.; HANCZKO, R.; TELARICO, T.; OAKS, Z.; LANDAS, S. Oxidative stress, inflammation and carcinogenesis are controlled through the pentose phosphate pathway by transaldolase. **Trends in Molecular Medicine**, v. 17, n. 7, p. 395-403, 2011.

RENNER, C.; ASPERGER, A.; SEYFFARTH, A.; MEIXENSBERGER, J.; GEBHARDT, R.; GAUNITZ, F. Carnosine inhibits ATP production in cells from malignant glioma. **Neurol Res**, v. 32, n., p., 2010a.

RENNER, C.; ZEMITZSCH, N.; FUCHS, B.; GEIGER, K. D.; HERMES, M.; HENGSTLER, J.; GEBHARDT, R.; MEIXENSBERGER, J.; GAUNITZ, F. Carnosine retards tumor growth in vivo in an NIH3T3-HER2/neu mouse model. **Molecular Cancer**, v. 9, n. 1, p. 2, 2010b.

RODRIGUES, M. D. P.; TARRAGÓ, O. F. B.; ARRUDA, R. P. D.; OLIVEIRA, L. Z.; BERTOLLA, R. P.; NICHI, M.; BARNABE, V. H. Perfil oxidativo e funcional de sêmen bovino criopreservado em diferentes estações do ano. **2015**, v. 52, n. 2, p. 7, 2015.

RYAN, B. J.; HOEK, S.; FON, E. A.; WADE-MARTINS, R. Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's: from familial to sporadic disease. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 40, n. 4, p. 200-210, 2015.

SIKKA, S. C. Andrology Lab Corner*: Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Andrology and Assisted Reproductive Technology. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 1, p. 5-18, 2004.

SILVA, E. C. B.; GUERRA, M. M. P. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio: produção e efeitos sobre a integridade estrutural e funcional dos espermatozoides. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 13, n. p. 9-16, 2010. Disponível em: <http://www.rcvt.org.br/volume13/Volume%2013_%202010%20de%209%20a%2016%20_Esp%C3%A9cies%20Reativas.pdf>. Acesso em: 13/02/2015.

VARNER, D. D.; GIBB, Z.; AITKEN, R. J. Stallion fertility: A focus on the spermatozoon. **Equine Veterinary Journal**, v. 47, n. 1, p. 16-24, 2015.

WATSON, P. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, n. 4, p. 871-891, 1995.

WISER, A.; SACHAR, S.; GHETLER, Y.; SHULMAN, A.; BREITBART, H. Assessment of sperm hyperactivated motility and acrosome reaction can discriminate the use of spermatozoa for conventional in vitro fertilisation or intracytoplasmic sperm injection: Preliminary results. **Andrologia**, v. 46, n. 3, p. 313-315, 2014.

WITTE, M. E.; MAHAD, D. J.; LASSMANN, H.; VAN HORSSSEN, J. Mitochondrial dysfunction contributes to neurodegeneration in multiple sclerosis. **Trends in Molecular Medicine**, v. 20, n. 3, p. 179-187, 2014.

WRIGHT, C.; MILNE, S.; LEESON, H. Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 28, n. 6, p. 684-703, 2014.

YESTE, M.; ESTRADA, E.; ROCHA, L. G.; MARÍN, H.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; MIRÓ, J. Cryotolerance of stallion spermatozoa is related to ROS production and mitochondrial membrane potential rather than to the integrity of sperm nucleus. **Andrology**, v. 3, n. 2, p. 395-407, 2015.



Capítulo 3

4 CAPÍTULO 3: Efeito da carnosina e do piruvato na criopreservação espermática de amostras espermáticas com alta e baixa congelabilidade seminal provenientes de garanhões

RESUMO

O espermatozoide é uma célula extremamente suscetível ao estresse oxidativo. No entanto, o plasma seminal possui uma série de compostos que protegem estas células contra danos oxidativos, dentre eles, a carnosina. Este dipeptídeo pode atuar contra o acúmulo do deletério subproduto da peroxidação lipídica, malondialdeído (MDA), sendo que o efeito protetor pode ser eliminado após a remoção do plasma seminal, etapa importante durante a criopreservação de espermatozoides equinos. Apesar dos efeitos benéficos da carnosina, estudos demonstraram que este dipeptídeo reage rapidamente com açúcares fosforilados intermediários da glicólise, o que reduz a produção de piruvato e consequentemente a geração de ATP por esta via e pelo ciclo do ácido cítrico. Espermatozoides equinos dependem principalmente da fosforilação oxidativa para gerar a energia necessária, processo que pode ser inibido pela redução da produção do piruvato. Desta forma, uma possível alternativa para melhorar a congelabilidade do sêmen equino seria a terapia com carnosina associada ao piruvato para prevenir seu efeito deletério sobre a produção energética. Portanto, amostras de garanhões de baixa congelabilidade (BC, perda de motilidade total > 50%) foram avaliadas após criopreservação com adição de carnosina (50mM) e piruvato (5mM) ao diluidor comercial. Amostras do grupo BC tratadas apenas com piruvato (5mM) apresentaram diminuição na porcentagem de células com baixa atividade mitocondrial; quando tratadas apenas com carnosina (50mM) apresentaram maior motilidade total, motilidade progressiva e maior porcentagem de células rápidas. Amostras do grupo BC apresentaram tendência ao aumento da velocidade progressiva e da atividade mitocondrial na presença de 5mM de piruvato e 50mM de carnosina. Estes resultados indicam que subprodutos da peroxidação lipídica, sendo o principal deles o MDA, podem causar danos às mitocôndrias e à cinética espermática. Neste contexto, a carnosina (50mM) parece auxiliar na manutenção da velocidade progressiva e atividade mitocondrial quando associada ao piruvato (5mM). Assim, a carnosina (50mM) e o piruvato (5mM) podem ser utilizados como forma de prevenção de crioinjúrias em amostras de baixa congelabilidade.

4.1 INTRODUÇÃO

A carnosina é um dipeptídeo de ocorrência natural que pode ser encontrado em muitos tecidos como no cérebro e bulbo olfatório. Também foi encontrado no sêmen de garanhões (DUCCI et al., 2005), suínos e ovinos (DUCCI et al., 2006). Apresenta inúmeras funções biológicas, dentre muitas funções atua como antioxidante relacionado à proteção contra subprodutos tóxicos da oxidação de lipídeos (e.g. Malondialdeído – MDA). A carnosina intervém contra o MDA modulando sua toxicidade e inibindo danos às proteínas (HIPKISS, ALAN R et al., 1997). Estudos anteriores de nosso grupo indicam uma grande suscetibilidade dos espermatozoides equinos ao malondialdeído na ausência do plasma seminal, condição obrigatória durante o processo de criopreservação. Com a remoção do plasma seminal, grande parte da carnosina presente no sêmen é também possivelmente eliminada. Desta forma, a carnosina parece ser uma alternativa interessante para a melhora da congelabilidade de amostras espermáticas de garanhões maus congeladores (KAWAI et al., 2017). No entanto, Oppermann e colaboradores (2016) relataram que este dipeptídeo pode influenciar na produção de ATP pela via glicolítica.

Gaunitz e colaboradores (2010a; 2010b) estudaram a influência da carnosina em cultivo de células de tumor cerebral e descobriram que a adição deste dipeptídeo inibiu o crescimento celular devido ao declínio na síntese de ATP da via glicolítica. Da mesma forma, Hipkiss e colaboradores (2013) estudaram um modelo para células tumorais e concluíram que a carnosina pode influenciar na glicólise. O cultivo de levedura com apenas uma fonte de carbono, a glicose, recebeu carnosina e causou até 20% de morte celular e diminuição da taxa de crescimento. Por outro lado, células que cresceram aerobiamente em glicerol como única fonte de carbono não foram inibidas pela carnosina e apresentaram maior taxa de crescimento. Isto sugere que a carnosina inibe a glicólise antes da formação da diidroxiacetona fosfato (DHAP) e gliceraldeído-3-fosfato (G3P), pois o glicerol é normalmente metabolizado via DHAP e G3P.

Em síntese, a carnosina elimina os intermediários da glicólise, reduz a produção de piruvato por glicólise e, portanto, reduz a geração de ATP e limita a produção de ATP pelo ciclo do ácido cítrico. Este efeito deletério poderia ser revertido com a suplementação celular com piruvato (HOLLIDAY; MCFARLAND, 1996).

Particularmente, a redução da produção do piruvato é prejudicial aos espermatozoides equinos, pois dependem principalmente da fosforilação oxidativa para gerar a energia necessária na manutenção da motilidade (DAVILA et al., 2016). Em estudo conduzido por

Davila e colaboradores (2016), ao inibirem a fosforilação oxidativa em espermatozoides equinos, observaram uma redução maior que 70% na VAP e os níveis de ATP diminuíram mais de 75% após a interrupção da cadeia de transporte de elétrons mitocondriais.

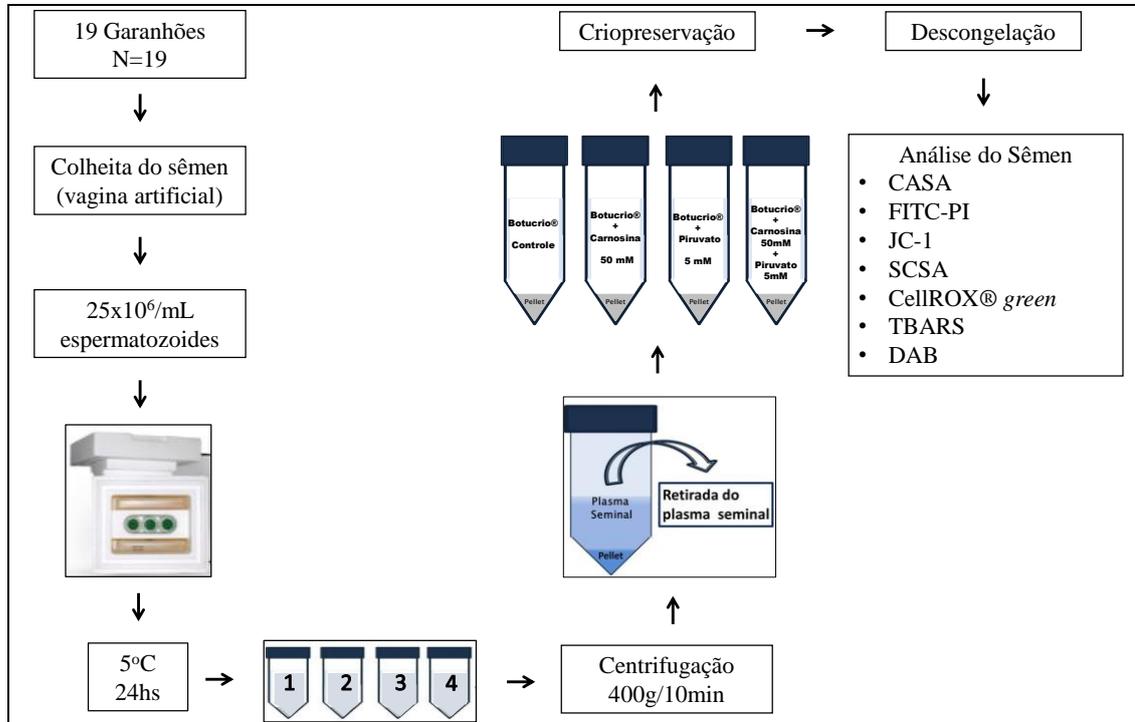
De fato, a carnosina influencia na síntese de piruvato, importante estimulante mitocondrial (HIPKISS, ALAN R.; GAUNITZ, 2014), e o fato do espermatozoide equino ser mais dependente da fosforilação oxidativa (GIBB; AITKEN, 2016), a prevenção da redução da síntese de piruvato (efeito deletério) pela carnosina é essencial. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o possível efeito sinérgico entre as moléculas de piruvato e carnosina na funcionalidade e homeostase oxidativa dos espermatozoides pós-descongelamento de amostras de garanhões com baixa congelabilidade.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

O presente experimento foi realizado de acordo com as diretrizes éticas para experimentos com animais e foi aprovado pelo Comitê de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (protocolo número 4149070115). A menos que indicado de outra forma, os reagentes utilizados no experimento foram adquiridos da empresa Sigma Chemical[®] (St. Louis, MO, EUA).

4.2.1 Delineamento experimental

Figura 8 – Delineamento experimental



4.2.2 Local e animais experimentais

As colheitas e avaliações iniciais do sêmen foram realizadas na Fazenda Santa Rita II localizada na cidade de Piracaia - SP. As avaliações do sêmen descongelado foram realizadas no Laboratório de Andrologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), no Departamento de Reprodução Animal (VRA) em São Paulo, SP. Foram utilizados 19 garanhões da raça Mangalarga Paulista, com idades variando entre 3 e 8 anos, alojados na respectiva fazenda sob manejo semi-intensivo, com água e sal ad libitum e suplementação concentrada diária.

4.2.3 Colheita de sêmen

Após prévia higienização do pênis com solução salina aquecida (37°C) e compressa umedecida, duas colheitas com intervalo de sete dias foram realizadas por vagina artificial modelo Botupharma® (Botupharma – Botucatu – Ltda/ME, Botucatu, São Paulo, Brasil), com auxílio de uma égua em estro, devidamente contida fisicamente. Todos os ejaculados foram

filtrados para remoção de gel e sujidades no momento da colheita.

4.2.4 Processamento e análise do sêmen

4.2.4.1 Criopreservação do sêmen

Previamente ao processamento, cada ejaculado foi avaliado quanto aos padrões de motilidade, vigor e concentração a partir da análise ao microscópio óptico e quanto ao volume em tubo de fundo cônico de 50mL. O resfriamento das amostras a +5°C foi realizado após a primeira avaliação do sêmen, perfazendo uma curva de 0,09°C/min.

Após 24 horas de estabilização a 5°C, o sêmen foi dividido em quatro tubos de fundo cônico de 15mL e centrifugado a 400xg durante 10 minutos para a retirada do plasma seminal. Os *pellets* foram suspensos a uma concentração final de 200x10⁶/mL com Botucrío[®] (Botupharma – Botucatu – Ltda/ME, Botucatu, São Paulo, Brasil) com a adição de carnosina (50mM), piruvato (5mM), carnosina (50mM) e piruvato (5mM), sendo o grupo controle suspenso apenas com Botucrío[®]. Palhetas contendo amostras e diferentes tratamentos foram acondicionadas em máquina de criopreservação automatizada TK3000[®] Compacta (TK Tecnologia em Congelação LTDA – Uberaba-MG - Brasil). Posteriormente, as amostras foram criopreservadas a uma velocidade de 15°C/min até atingirem -120°C e imersas em nitrogênio líquido.

4.2.4.2 Congelabilidade

Esp ermatozoides criopreservados de garanhões apresentam grande variabilidade entre indivíduos em relação à viabilidade celular após a descongelação (HOFFMANN et al., 2011). De acordo com Ramires Neto et al. (2014), as amostras foram divididas em alta congelabilidade (AC) quando apresentaram perda de motilidade total menor que 50% e baixa congelabilidade (BC) quando apresentaram perda de motilidade total maior que 50%, após avaliação da motilidade pelo Sistema Computadorizado de Análise Espermática.

4.2.4.3 Análise do sêmen descongelado

Após a descongelação, as amostras seminais foram avaliadas pelo sistema computadorizado de análise espermática e pelos testes de integridade de membranas

plasmática (PI-Iodeto de Propídio) e acrossomal (FITC-PSA- *Pisum sativum* conjugada a Isotiocinato de fluoresceína), potencial de membrana mitocondrial (JC-1, iodeto de 5, 5, 6, 6' tetracloro 1, 1, 3, 3' tetraetilbenzimidazolilcarbocianina), suscetibilidade da cromatina à denaturação ácida (SCSA) e a produção de EROs (CellRox[®] *green*) utilizando o citômetro de fluxo Guava EasyCyte[™] Mini System (Guava Technologies) do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Além disso, foram avaliadas quanto à suscetibilidade do espermatozoide à peroxidação lipídica (ensaio TBARS), à atividade mitocondrial (3'3 diaminobenzidina).

4.2.4.3.1 *Sistema computadorizado de análise espermática (Casa - Computer Assisted Sperm Analysis; Hamilton-Thorne)*

Os parâmetros de cinética espermática foram analisados pelo Sistema Computadorizado de Análise Espermática (CASA - *Computer Assisted Sperm Analysis*; Hamilton Thorne IVOS 12.3, USA) logo após a descongelamento das amostras. Seis μL de cada amostra espermática foram inseridos em uma câmara de contagem Leja previamente aquecida a 37°C e cinco campos foram selecionados aleatoriamente. Foram analisado parâmetros de motilidade espermática total (motilidade, %), motilidade espermática progressiva (progressivos, %), velocidade média de percurso (VAP, $\mu\text{/s}$), velocidade retilínea (VSL, $\mu\text{/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{/s}$), amplitude do movimento lateral da cabeça (ALH, μm), frequência de batimento cruzado (BCF, Hz), retilinearidade (STR = VSL/VCL, %) e linearidade (LIN = VSL/VCL, %) (NICHI, 2009; HAMILTON et al., 2016). Adicionalmente, os espermatozoides foram divididos em quatro grupos baseando-se na velocidade de movimento, que consistiu: rápidos (VAP > 50 $\mu\text{/s}$; %), médios (20 $\mu\text{/s}$ < VAP < 50 $\mu\text{/s}$; %) e espermatozoides imóveis (%) (ALBRIZIO et al., 2010). O *setup* do CASA utilizado neste experimento está descrito na Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros avaliados pelo sistema computadorizado de análises espermáticas (CASA) *Computer Assisted Sperm Analysis* – São Paulo – 2017

Características	Ajuste
Número de imagens adquiridas	40
Taxa de aquisição das imagens	60 Hz
Contraste mínimo da célula	80 pixels
Tamanho mínimo da célula	3 pixels
Contraste para células imóveis	5 pixels
Intensidade para células imóveis	110
Limite para velocidade média de percurso	50 μ /s
Limite para índice retilíneo	75%
Referência de VAP para células lentas	20 μ /s
Referência de VSL para células lentas	0,0 μ /s
Limite superior de tamanho da célula	2,99
Limite inferior de tamanho da célula	0,59
Limite superior de intensidade estática da célula	1,74
Limite inferior de intensidade estática da célula	0,68
Limite superior de alongamento da célula	97%
Limite inferior de alongamento da célula	12%
Temperatura	37°C

4.2.4.3.2 *Testes morfo-funcionais*

4.2.4.3.2.1 *Integridade de membrana plasmática e acrossomal*

Para avaliar a integridade de membrana plasmática utilizou-se 3 μ L da sonda fluorescente Iodeto de Propídio (PI, 6 μ M) e para a avaliação da integridade acrossomal, utilizou-se 50 μ L da sonda *Pisum sativum* conjugada a Isotiocinato de fluoresceína (FITC-PSA, 100 μ g/mL, G7462, Promega). As sondas foram incubadas com 200.000

espermatozoides a 37°C, durante 5 minutos na mesma amostra para obter um resultado combinado da mesma população de células. A população de espermatozoides foi identificada e selecionada de acordo com o tamanho e a fluorescência e os gráficos foram analisados com auxílio do software FlowJo v8.7 (Flow Cytometry analysis Software – Tree Star Inc., Ashland, Oregon, USA). A população de interesse distribuiu-se em duas subpopulações de acordo com a intensidade de fluorescência verde. O gráfico foi transformado em histograma e o ponto de encontro da queda da população de baixa fluorescência e do aumento da população de alta fluorescência foi utilizado como ponto de corte. Assim, células com fluorescência superior foram consideradas verdes positivas, indicando acrossomo íntegro (AI); células que apresentaram fluorescência inferior foram consideradas verdes negativas, indicando acrossomo lesado (AL). Da mesma forma para a fluorescência vermelha, células com fluorescência superior foram consideradas vermelhas positivas, indicando membrana plasmática lesada (ML); células que apresentaram fluorescência inferior foram consideradas vermelhas negativas, indicando membrana plasmática íntegra (MI). Aplicando os cortes para as duas fluorescências simultaneamente na mesma população de células, obtivemos quatro populações (AIMI, AIML, ALMI e ALML). As amostras foram analisadas por citometria de fluxo, excitadas a 488nm e detectadas a 630-650nm (PI) e 515-530nm (FITC).

4.2.4.3.2.2 *Potencial de membrana mitocondrial*

Para determinar o potencial de membrana mitocondrial, 2µL da sonda iodeto de 5, 5, 6, 6' tetracloro 1, 1, 3, 3' tetraetilbenzimidazolilcarbocianina (JC-1, 50µg/mL, Invitrogen, Eugene, OR, USA) foram incubados com 200.000 células a 37°C, durante 5 minutos. Quando a membrana mitocondrial apresenta alto potencial floresce em verde; quando apresenta baixo potencial mitocondrial floresce em vermelho. As células espermáticas podem apresentar graduações do potencial mitocondrial, o que possibilita a identificação de uma população intermediária. Dessa forma, para captar todos os possíveis espectros de fluorescência, foi necessário utilizar a fluorescência amarela. Para isso, foram estabelecidos dois pontos de corte ao longo da intensidade de fluorescência com base na distribuição das células. A população com fluorescência superior foi definida como população de alto potencial de membrana mitocondrial, a população entre os dois pontos de corte foi definida com potencial de membrana mitocondrial intermediário e a população com fluorescência inferior foi definida como população com baixo potencial de membrana mitocondrial. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo, excitadas a 488nm e detectadas a 590nm.

4.2.4.3.2.3 *Integridade de DNA*

O ensaio da estrutura da cromatina espermática adaptado do protocolo descrito por (BOE-HANSEN et al.) é uma técnica que determina quantitativamente a integridade da cromatina espermática, definida pela suscetibilidade do DNA à denaturação ácido-induzida “in situ”. Foram adicionadas 200.000 células em 50µL de tampão TNE (Tris-HCl 0,01M, NaCl 0,15M, EDTA 1mM e água destilada, pH 7,4) e 100µL de detergente ácido (HCl 0,08M, NaCl 0,15M e Triton X-100 0,1% em água destilada, pH 1,2). Após incubação a 37°C foram adicionados 300µL de solução de Laranja de Acridina (ácido cítrico 0,1M, Na₂HPO₄ 0,2M, EDTA 0,001M, NaCl 0,15M e solução estoque de Laranja de Acridina 6µg/mL em água destilada, pH 6). Foi necessário caracterizar o controle negativo da população de células (não suscetíveis à ação do detergente ácido e que emitem fluorescência verde) e o controle positivo (susceptíveis à ação do detergente ácido ou que emitem fluorescência vermelha). Para a caracterização das populações, uma amostra de sêmen foi incubada com peróxido de hidrogênio (30%) na proporção 1:2, respectivamente para realizar o controle positivo; o controle negativo foi definido com uma amostra descongelada e lavada do mesmo animal e mesma partida. Inicialmente, o controle negativo e positivo foram submetidos ao SCSA para obter um pico de cada controle no histograma AlfaTYlog. Após, a amostra formada foi analisada com a mistura dos dois controles em proporções iguais (50%) para obter dois picos. O ponto médio entre os dois picos foi estabelecido como ponto de corte para a consideração das células positivas ou negativas para o SCSA. O AlfaTYlog é o resultado da divisão da fluorescência vermelha pela fluorescência total (vermelho e verde) e é utilizado para quantificar a extensão da denaturação da estrutura da cromatina de cada espermatozoide. A leitura foi realizada com excitação a 488nm e detectado a 630-650nm (vermelho) e 515-530nm (verde).

4.2.4.3.2.4 *Atividade mitocondrial*

Para avaliar a atividade mitocondrial, utilizamos a técnica citoquímica da 3’3 diaminobenzidina (Ensaio DAB), o qual é oxidado pela enzima citocromo C e forma um complexo marrom depositado em mitocôndrias ativas (HRUDKA, 1987). Para realizar esta técnica, uma alíquota de 20µL de amostra foi incubada na proporção 1:1 com diaminobenzidina (1mg/mL de PBS) em um tubo de microcentrífuga âmbar durante 1 hora a 37°C. Após a incubação, a mistura foi depositada em lâminas de microscopia em local

protegido da luz. As lâminas foram fixadas em formol a 10% durante 10 minutos e secas no ar ao abrigo da luz. A leitura das lâminas foi realizada em microscopia com contraste de fase em magnificação de 1000 vezes, sob óleo de imersão, onde foram contadas 100 células. Estas células foram classificadas em quatro classes de acordo com a porcentagem de mitocôndrias ativas: peça intermediária totalmente corada, indicando alta atividade mitocondrial (DAB I), mais de 50% da peça intermediária corada, indicando média atividade mitocondrial (DAB II), menos de 50% da peça intermediária corada, indicando baixa atividade mitocondrial (DAB III) e peça intermediária totalmente descorada, indicando ausência de atividade mitocondrial (DAB IV).

4.2.4.3.2.5 *Status oxidativo*

Para avaliar o status oxidativo, foi utilizada uma sonda fluorescente penetrante que quando oxidada por radicais livres intracelulares, liga-se ao DNA e emite maior intensidade de fluorescência verde (CellROX® *green*, Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). Nesta técnica, foi adicionado PI (6µM) nos últimos 10 minutos de incubação (37°C) e a leitura foi realizada com excitação de 488nm e detectadas a 630-650nm (PI) e 515-530nm (CellROX® *green*) (DE CASTRO et al., 2015). Os dados foram analisados a partir da população de célula com: estresse oxidativo e membrana íntegra (EOx⁺MI).

A suscetibilidade do espermatozoide ao estresse oxidativo foi avaliada pelo ensaio TBARS (Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico), de acordo com a metodologia de Nichi et al. (2006), adaptado de Ohkawa; Ohishi; Yagi (1979). A peroxidação lipídica foi induzida nas amostras pela incubação de 200µL de sêmen com 50µL de ácido ascórbico (20mM) e 50µL de sulfato de ferro (4mM) em banho seco a 37°C, durante 90 minutos (GOMEZ; IRVINE; AITKEN, 1998). Após a indução, foram adicionados 600µL de ácido tricloroacético 10% gelado. As amostras foram centrifugadas a 20800xg durante 15 minutos (5°C) para precipitação de proteínas e debris. Em criotubos, foram recuperadas alíquotas de 800µL do sobrenadante. Foram adicionados 800µL de ácido tiobarbitúrico 1% e incubadas a 95°C em banho-maria, durante 15 minutos. O complexo róseo, formado pela reação entre o ácido tiobarbitúrico e malondialdeído (principal produto da peroxidação lipídica), foi quantificado por meio de espectrofotometria (Ultrospec 3300 PRO®, Amersham Biosciences, EUA) com comprimento de onda de 532 nanômetros. A suscetibilidade dos espermatozoides à peroxidação lipídica foi expressa em nanogramas de TBARS/10⁶ espermatozoides.

4.2.5 Análise estatística

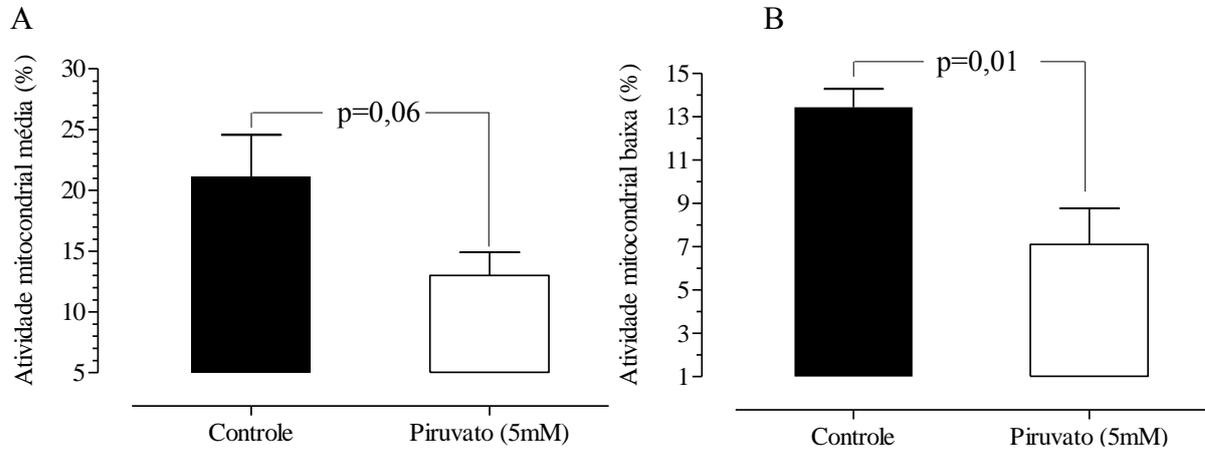
Os dados obtidos foram analisados pelo programa SAS System for Windows 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). A análise de interação entre os fatores congelabilidade (alta e baixa) e tratamentos (controle, carnosina 100mM, piruvato 5mM, carnosina e piruvato) foi realizada pelo PROC GLM. Com auxílio do aplicativo Guided Data Analysis, os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos (distribuição normal) e homogeneidade das variâncias, dessa forma o efeito entre os fatores congelabilidade e tratamentos foi determinado pelo teste paramétrico LSD (*Least Significant Difference*) e não paramétrico, Wilcoxon. Além disso, foram realizados testes de correlação paramétricos (Pearson) e não paramétricos (Spearman). O nível de significância utilizado para rejeitar H₀ (hipótese de nulidade) foi de 5%. Os resultados estão apresentados por médias (média ± erro padrão da média) dos dados originais.

4.3 RESULTADOS

Os resultados referentes ao efeito da carnosina (0 e 50mM), do piruvato (0 e 5mM) e da interação carnosina*piruvato nas amostras de alta e baixa congelabilidade estão descritos na Tabela 5 Tabela 6, respectivamente no material complementar.

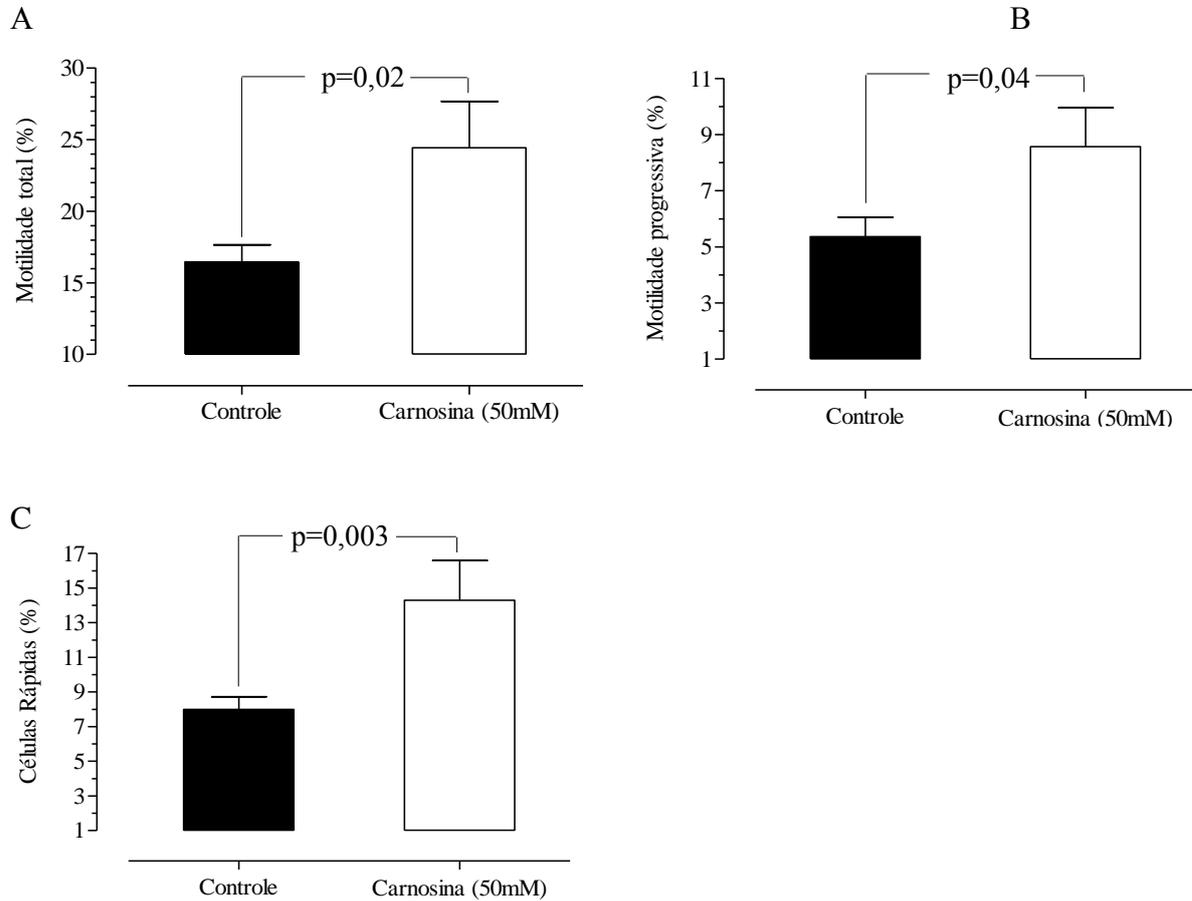
Os resultados referentes ao efeito do piruvato (5mM) e da carnosina (50mM) analisados separadamente para todas as variáveis nas amostras de baixa congelabilidade estão descritos na Tabela 7 e Tabela 8, respectivamente no material complementar. Não observamos diferença na suscetibilidade do espermatozoide ao estresse oxidativo (TBARS) entre os tratamentos. Porém houve alta correlação negativa entre TBARS e células móveis ($r=-0,52$; $p=0,005$), rápidas ($r=-0,40$; $p=0,04$) e com integridade de membranas plasmática e acrossomal ($r=-0,32$; $p=0,09$). Além disso, observamos uma correlação positiva entre TBARS e células estáticas ($r=0,46$; $p=0,01$). Amostras de baixa congelabilidade tratadas apenas com piruvato (5mM) apresentaram diminuição na porcentagem de células com baixa atividade mitocondrial (Figura 9).

Figura 9 - Efeito do piruvato (5mM) na porcentagem de células com atividade mitocondrial média (DABII, %, A) e atividade mitocondrial baixa (DAB III, %, B) de amostras criopreservadas de equinos com baixa congelabilidade – São Paulo – 2017



Amostras de baixa congelabilidade tratadas apenas com carnosina (50mM) apresentaram maior motilidade total, motilidade progressiva e maior porcentagem de células rápidas (Figura 10).

Figura 10 - Efeito da carnosina (50mM) na motilidade total (%), A), motilidade progressiva (%), B) e células rápidas (%), C) de amostras criopreservadas de equinos com baixa congelabilidade – São Paulo – 2017



Observamos que amostras de baixa congelabilidade apresentaram tendência ao aumento da velocidade progressiva e da atividade mitocondrial na presença de 5mM de piruvato e 50mM de carnosina (Figura 11 e Figura 12, respectivamente).

Figura 11 - Efeito do piruvato (5mM) e da carnosina (50mM) na velocidade progressiva (VSL, %) de amostras criopreservadas de equinos com baixa congelabilidade – São Paulo – 2017

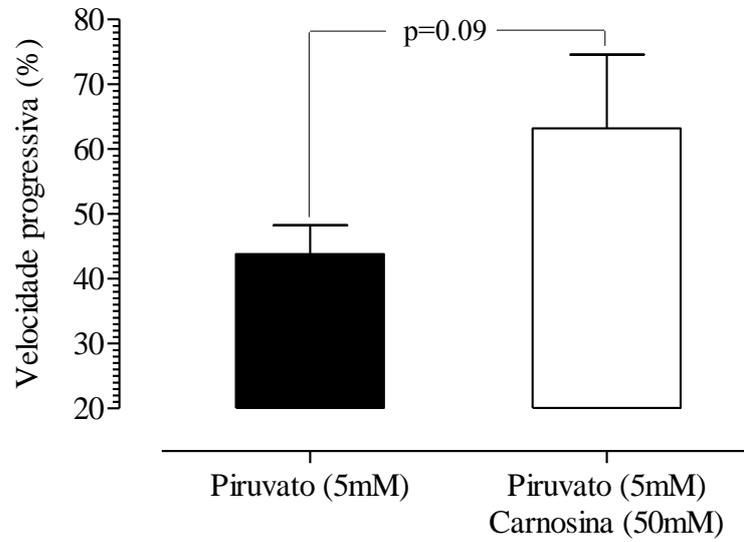
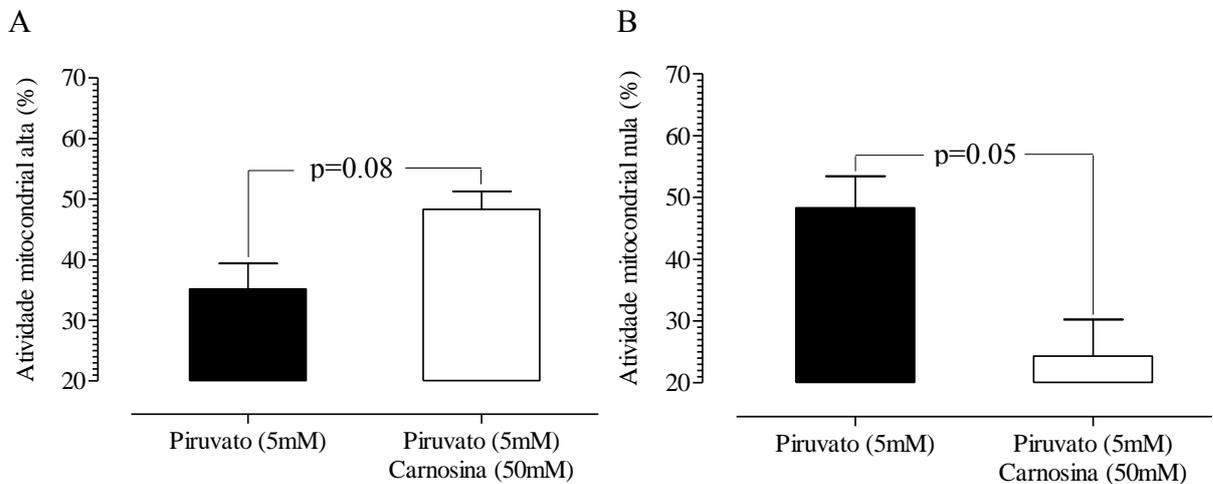


Figura 12 - Efeito do piruvato (5mM) e da carnosina (50mM) na atividade mitocondrial (DAB I, A e DAB IV, B, %) em amostras criopreservadas de equinos com baixa congelabilidade – São Paulo – 2017



4.4 DISCUSSÃO

Apesar das inúmeras funções biológicas da carnosina, como inibidora de glicação proteica, agente anti-inflamatório, eliminadora de radicais livres, tampão, neurotransmissora (SHEN et al., 2014a), antioxidante, quelante de íons metálicos, imuno-estimulante e cicatrizante (HIPKISS; GAUNITZ, 2014), este dipeptídeo pode influenciar negativamente na produção de ATP pela via glicolítica (OPPERMANN et al., 2016). Muitos estudos sugerem que a carnosina pode inibir a glicólise antes da formação da diidroxiacetona fosfato (DHAP) e gliceraldeído-3-fosfato (G3P), resultando em baixos níveis de piruvato e menor produção de ATP (HIPKISS; GAUNITZ, 2014). Nesse sentido, espermatozoides equinos podem ser prejudicados, pois são mais dependentes da fosforilação oxidativa para manutenção da motilidade, capacitação ou reação acrossomal (GIBB; AITKEN, 2016) e a prevenção da redução da síntese de piruvato (efeito deletério) pela carnosina é essencial. Dessa forma, objetivamos avaliar o possível efeito sinérgico entre as moléculas de piruvato e carnosina na funcionalidade e homeostase oxidativa dos espermatozoides pós-descongelamento de amostras de garanhões com baixa congelabilidade.

Avaliando o efeito da carnosina 50mM separadamente, independente da presença ou ausência de piruvato, observamos maior motilidade, velocidade progressiva e células rápidas. Como não houve interação destas variáveis, não foi possível afirmar que estas diferenças ocorreram devido à ação do piruvato. No entanto, acreditamos que o piruvato pode ter influenciado, pois não observamos melhora da cinética espermática no primeiro experimento. Além disso, neste experimento as amostras foram refrigeradas e estabilizadas a +5°C durante 24 horas e posteriormente foram criopreservadas em máquina. Em um experimento semelhante, Oliveira e colaboradores (2015), observaram menor motilidade em amostras refrigeradas durante 24 horas a 16°C quando comparadas com o sêmen fresco (OLIVEIRA; DUARTE; GAMBARINI, 2015). Isso pode indicar que a carnosina pode ter sido mais eficiente nestas células que foram submetidas a um tempo maior de estabilização a +5°C, atuando na manutenção destas características de cinética espermática.

Analisando o efeito do piruvato na presença de carnosina, observamos uma tendência no aumento da velocidade progressiva e da atividade mitocondrial, indicando melhora da qualidade do movimento celular. Isso pode ter ocorrido devido à proteção da mitocôndria durante a criopreservação e ao efeito estimulante do piruvato na fosforilação oxidativa. A carnosina apresenta um efeito inibitório sobre o crescimento de células transformadas, tanto *in vitro* como *in vivo*. Demonstrou-se que a carnosina pode inibir o crescimento e a proliferação

de células tumorais pela supressão da glicólise (BAO et al., 2016). Recentemente, a importância da mitocôndria como sensores de oxigênio, bem como produtores de ATP tornou-se o principal foco da investigação do câncer. Estudos tem demonstrado um fenômeno em que o metabolismo mitocondrial, particularmente a atividade do ciclo do ácido cítrico é importante para a rápida proliferação de células tumorais (SHEN et al., 2014b). Segundo Holliday e Mcfarland (1996), em células tumorais, o grupo amino terminal da carnosina reage fortemente com aldeídos e ceto grupos de açúcares pela reação de Amadori. Ela atua como inibidor competitivo da glicação não enzimática de proteínas e reage rapidamente com os açúcares fosforilados intermediários da glicólise, particularmente gliceraldeído-3-fosfato e diidroxiacetona fosfato. Em síntese, a carnosina elimina os intermediários da glicólise, reduz a produção de piruvato (estimulante mitocondrial) pela glicólise e, portanto, reduz a geração de ATP e limita a produção de ATP pelo ciclo do ácido cítrico (HIPKISS; GAUNITZ, 2014).

Em espermatozoides equinos, as proteínas transportadoras de glicose estão localizadas na cauda e no acrossomo. Isto sugere que a via glicolítica está envolvida na produção de energia para que modificações de membrana possam ocorrer durante os processos de capacitação e reação acrossomal (VARNER; GIBB; AITKEN, 2015). Entretanto, nos espermatozoides equinos, essas proteínas transportadoras de glicose não sofrem alterações nos processos de capacitação, sugerindo que espécies dependentes da fosforilação oxidativa como os equinos, a glicólise é dispensável para a manutenção da motilidade, capacitação ou reação acrossomal (GIBB; AITKEN, 2016).

A mitocôndria parece ser mais importante para a manutenção dos padrões de movimento do que para a manutenção da motilidade como descrito por Losano e colaboradores (2017). Isso destaca a importância da associação da carnosina com piruvato e sugere que o efeito sinérgico entre ambas as moléculas supra os níveis de piruvato que a carnosina poderia ter diminuído. De fato, o piruvato é um estimulante mitocondrial que participa do ciclo de Krebs, produzindo transportadores de elétrons essenciais para fosforilação oxidativa (NELSON; LEHNINGER; COX, 2008).

Apenas na presença do piruvato, independente da carnosina, observamos diminuição na atividade mitocondrial baixa. Estudos utilizando o ensaio citoquímico da diaminobenzidina mostraram que a baixa atividade mitocondrial está relacionada com altos níveis de estresse oxidativo e fragmentação de DNA (BLUMER et al., 2008). Este resultado indica que baixos níveis de piruvato decorrente da inibição da via glicolítica podem estar relacionados com o aumento da peroxidação lipídica, comprovando a importância desta molécula para a homeostase oxidativa (BILODEAU et al., 2002).

Devido ao efeito protetor da mitocôndria, não observamos diferença na suscetibilidade do espermatozoide ao estresse oxidativo (TBARS) entre os tratamentos. Porém houve alta correlação negativa entre TBARS e células móveis, rápidas e com integridade de membranas plasmática e acrossomal. Além disso, observamos uma correlação positiva entre TBARS e células estáticas. O potencial efeito protetor da carnosina está relacionado com a atividade antioxidante, mediada por diferentes mecanismos como a capacidade de quelar metais e debelar EROs (MILEWSKI et al., 2016). Isso pode indicar que a carnosina foi eficiente em amostras de baixa congelabilidade, o que não ocorreu em amostras de alta congelabilidade.

Devido aos mecanismos supracitados, a associação entre piruvato e carnosina parece ser um tratamento interessante para o processo de criopreservação espermática, já que a carnosina poderia prevenir efeitos oxidativos durante este procedimento, enquanto o piruvato preveniria o efeito deletério deste dipeptídeo, mantendo os níveis de ATP e consequentemente a homeostase energética celular. Além disso, a associação entre piruvato e carnosina parece ser ainda mais essencial para os espermatozoides da espécie equina. Isto porque, particularmente, a redução dos níveis de piruvato é prejudicial aos espermatozoides equinos, pois dependem principalmente da fosforilação oxidativa para gerar energia necessária para a manutenção de sua funcionalidade (GIBB et al., 2015; DAVILA et al., 2016). Além disso, a retirada do plasma durante o processamento seminal para a criopreservação na espécie equina exige uma proteção exógena contra danos oxidativos (VASCONCELOS FRANCO et al., 2013).

Desta forma, a terapia espermática com carnosina durante a criopreservação parece ser promissora. No entanto, estudos nesta área são escassos na literatura científica. Tampouco se sabe a respeito do possível efeito sinérgico entre a carnosina e o piruvato na função espermática.

REFERÊNCIAS

- ALBRIZIO, M.; LACALANDRA, G. M.; MICERA, E.; GUARICCI, A. C.; NICASSIO, M.; ZARRILLI, A. Delta opioid receptor on equine sperm cells: subcellular localization and involvement in sperm motility analyzed by computer assisted sperm analyzer (CASA). *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 8, n. 1, p. 78, 2010.
- BAO, Y.; DING, S.; CHENG, J.; LIU, Y.; WANG, B.; XU, H.; SHEN, Y.; LYU, J. Carnosine Inhibits the Proliferation of Human Cervical Gland Carcinoma Cells Through Inhibiting Both Mitochondrial Bioenergetics and Glycolysis Pathways and Retarding Cell Cycle Progression. *Integrative Cancer Therapies*, v., n., p. 1534735416684551, 2016.
- BILODEAU, J.-F.; BLANCHETTE, S.; CORMIER, N.; SIRARD, M.-A. Reactive oxygen species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. *Theriogenology*, v. 57, n. 3, p. 1105-1122, 2002.
- BLUMER, C. G.; FARIELLO, R. M.; RESTELLI, A. E.; SPAINE, D. M.; BERTOLLA, R. P.; CEDENHO, A. P. Sperm nuclear DNA fragmentation and mitochondrial activity in men with varicocele. *Fertility and Sterility*, v. 90, n. 5, p. 1716-1722, 2008.
- BOE-HANSEN, G. B.; MORRIS, I. D.; ERSBØLL, A. K.; GREVE, T.; CHRISTENSEN, P. DNA integrity in sexed bull sperm assessed by neutral Comet assay and sperm chromatin structure assay. *Theriogenology*, v. 63, n. 6, p. 1789-1802.
- DAVILA, M. P.; MUÑOZ, P. M.; BOLAÑOS, J. M. G.; STOUT, T. A. E.; GADELLA, B. M.; TAPIA, J. A.; DA SILVA, C. B.; FERRUSOLA, C. O.; PEÑA, F. J. Mitochondrial ATP is required for the maintenance of membrane integrity in stallion spermatozoa, whereas motility requires both glycolysis and oxidative phosphorylation. *Reproduction*, v. 152, n. 6, p. 683-694, 2016.
- DE CASTRO, L. S.; DE ASSIS, P. M.; SIQUEIRA, A. F.; HAMILTON, T. R.; MENDES, C. M.; LOSANO, J. D.; NICHI, M.; VISINTIN, J. A.; ASSUMPÇÃO, M. E. Sperm Oxidative Stress Is Detrimental to Embryo Development: A Dose-Dependent Study Model and a New and More Sensitive Oxidative Status Evaluation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2016, n., p., 2015.
- DUCCI, M.; PACCHINI, S.; NICCOLINI, A.; VIALE, A.; GAZZANO, A.; MARTELLI, F.; GADEA, J. Poster Abstracts - Quantitative Determination of Imidazole Dipeptides in Stallion Spermatozoa and Seminal Plasma. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 40, n. 4, p. 379-379, 2005.
- DUCCI, M.; PACCHINI, S.; NICCOLINI, A.; GAZZANO, A.; CERRI, D.; GADEA, J.; BOBOWIEC, R.; SIGHIERI, C.; MARTELLI, F. Concentrations of carnosine, anserine, L-histidine and 3-methyl histidine in boar spermatozoa and sheep milk by a modified HPLC method. *Polish journal of veterinary sciences*, v. 9, n. 3, p. 159-163, 2006.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 43, n., p.

61-68, 1997.

GIBB, Z.; LAMBOURNE, S. R.; QUADRELLI, J.; SMITH, N. D.; AITKEN, R. J. L-carnitine and pyruvate are prosurvival factors during the storage of stallion spermatozoa at room temperature. **Biology of reproduction**, v. 93, n. 4, p. 104, 2015.

GIBB, Z.; AITKEN, R. J. The Impact of Sperm Metabolism during In Vitro Storage: The Stallion as a Model. **BioMed Research International**, v. 2016, n., p. 8, 2016.

GOMEZ, E.; IRVINE, D.; AITKEN, R. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxy-alkenals in human spermatozoa: Relationships with semen quality and sperm function. **International journal of andrology**, v. 21, n. 2, p. 81-94, 1998.

HAMILTON, T. R. D. S.; MENDES, C. M.; CASTRO, L. S. D.; ASSIS, P. M. D.; SIQUEIRA, A. F. P.; DELGADO, J. D. C.; GOISSIS, M. D.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. Á.; NICHI, M.; VISINTIN, J. A.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. D. Á. Evaluation of Lasting Effects of Heat Stress on Sperm Profile and Oxidative Status of Ram Semen and Epididymal Sperm. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, n., p. 12, 2016.

HIPKISS, A. R.; PRESTON, J. E.; HIMSWOTH, D. T.; WORTHINGTON, V. C.; ABBOT, N. J. Protective effects of carnosine against malondialdehyde-induced toxicity towards cultured rat brain endothelial cells. **Neuroscience letters**, v. 238, n. 3, p. 135-138, 1997.

HIPKISS, A. R.; CARTWRIGHT, S. P.; BROMLEY, C.; GROSS, S. R.; BILL, R. M. Carnosine: can understanding its actions on energy metabolism and protein homeostasis inform its therapeutic potential? **Chemistry Central Journal**, v. 7, n. 1, p. 38, 2013.

HIPKISS, A. R.; GAUNITZ, F. Inhibition of tumour cell growth by carnosine: some possible mechanisms. **Amino Acids**, v. 46, n. 2, p. 327-337, 2014.

HOFFMANN, N.; OLDENHOF, H.; MORANDINI, C.; ROHN, K.; SIEME, H. Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified 'good' or 'poor' for freezing. **Animal Reproduction Science**, v. 125, n. 1-4, p. 112-118, 2011.

HOLLIDAY, R.; MCFARLAND, G. A. Inhibition of the growth of transformed and neoplastic cells by the dipeptide carnosine. **British Journal of Cancer**, v. 73, n. 8, p. 966-971, 1996.

HRUDKA, F. Cytochemical and ultracytochemical demonstration of cytochrome c oxidase in spermatozoa and dynamics of its changes accompanying ageing or induced by stress. **International Journal of Andrology**, v. 10, n. 6, p. 809-828, 1987.

KAWAI, G.; GURGEL, J.; LOSANO, J.; DALMAZZO, A.; ROCHA, C.; TSUNODA, R.; GÓES, P.; RUI, B.; ANGRIMANI, D.; ASSUMPÇÃO, M. Susceptibility of stallion spermatozoa to different oxidative challenges: role of seminal plasma. *Journal of Equine Veterinary Science*, v., n., p., 2017.

LOSANO, J. D. A.; ANGRIMANI, D. S. R.; DALMAZZO, A.; RUI, B. R.; BRITO, M. M.; MENDES, C. M.; KAWAI, G. K. V.; VANNUCCHI, C. I.; ASSUMPÇÃO, M.; BARNABE,

V. H.; NICHI, M. Effect of mitochondrial uncoupling and glycolysis inhibition on ram sperm functionality. **Reproduction in Domestic Animals**, v., n., p. n/a-n/a, 2017.

MILEWSKI, K.; HILGIER, W.; FREŚKO, I.; POLOWY, R.; PODSIADŁOWSKA, A.; ZOŁOCIŃSKA, E.; GRYMANOWSKA, A. W.; FILIPKOWSKI, R. K.; ALBRECHT, J.; ZIELIŃSKA, M. Carnosine Reduces Oxidative Stress and Reverses Attenuation of Righting and Postural Reflexes in Rats with Thioacetamide-Induced Liver Failure. **Neurochemical Research**, v. 41, n. 1, p. 376-384, 2016.

NELSON, D. L.; LEHNINGER, A. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**: Macmillan, 2008.

NICHI, M.; BOLS, P. E. J.; ZÜGE, R. M.; BARNABE, V. H.; GOOVAERTS, I. G. F.; BARNABE, R. C.; CORTADA, C. N. M. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. **Theriogenology**, v. 66, n. 4, p. 822-828, 2006.

NICHI, M. **Efeito do tratamento com antioxidantes e ácidos graxos poli-insaturados em amostras espermáticas epididimárias de touros**. Universidade de São Paulo, 2009.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, p. 351-358, 1979.

OLIVEIRA, R. A.; DUARTE, F. B.; GAMBARINI, M. L. Comparison between the conventional and automated systems for frozen cooled equine semen. **2015**, v. 12, n. 2, p. 4, 2015.

OPPERMANN, H.; SCHNABEL, L.; MEIXENSBERGER, J.; GAUNITZ, F. Pyruvate attenuates the anti-neoplastic effect of carnosine independently from oxidative phosphorylation. **Oncotarget**, v., n., p., 2016.

RAMIRES NETO, C.; MONTEIRO, G. A.; SANCLER-SILVA, Y. F. R.; PAPA, P.; GUASTI, P. N.; RESENDE, H. L.; PAPA, F. O.; DELL'AQUA, J. A., JR.; ALVARENGA, M. A. Comparison of different freezing extenders for semen cryopreservation from stallions with poor and good semen freezability. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34, n. 1, p. 58-60, 2014.

RENNER, C.; ASPERGER, A.; SEYFFARTH, A.; MEIXENSBERGER, J.; GEBHARDT, R.; GAUNITZ, F. Carnosine inhibits ATP production in cells from malignant glioma. **Neurol Res**, v. 32, n., p., 2010a.

RENNER, C.; ZEMITZSCH, N.; FUCHS, B.; GEIGER, K. D.; HERMES, M.; HENGSTLER, J.; GEBHARDT, R.; MEIXENSBERGER, J.; GAUNITZ, F. Carnosine retards tumor growth in vivo in an NIH3T3-HER2/neu mouse model. **Molecular Cancer**, v. 9, n. 1, p. 2, 2010b.

SHEN, Y.; TIAN, Y.; YANG, J.; SHI, X.; OUYANG, L.; GAO, J.; LU, J. Dual effects of carnosine on energy metabolism of cultured cortical astrocytes under normal and ischemic conditions. **Regulatory Peptides**, v. 192-193, n., p. 45-52, 2014a.

SHEN, Y.; YANG, J.; LI, J.; SHI, X.; OUYANG, L.; TIAN, Y.; LU, J. Carnosine Inhibits the Proliferation of Human Gastric Cancer SGC-7901 Cells through Both of the Mitochondrial Respiration and Glycolysis Pathways. **PLOS ONE**, v. 9, n. 8, p. e104632, 2014b.

VARNER, D. D.; GIBB, Z.; AITKEN, R. J. Stallion fertility: A focus on the spermatozoon. **Equine Veterinary Journal**, v. 47, n. 1, p. 16-24, 2015.

APÊNDICE A - Material complementar

Tabela 3 – Efeito da congelabilidade (alta e baixa), da carnosina e da interação congelabilidade * carnosina nas variáveis avaliadas pela análise espermática computadorizada (CASA), na análise concomitante da integridade de membrana plasmática e acrossomo, na avaliação do *status* oxidativo, função mitocondrial e integridade de DNA – São Paulo –2017.

	Congelabilidade	Carnosina	Car*Congelab
VAP (μ/s)	0,02	0,30	0,32
VSL (μ/s)	0,08	0,80	0,22
VCL (μ/s)	0,06	0,31	0,57
ALH (μm/s)	0,16	0,0006	0,82
BCF (Hz)	0,07	0,22	0,25
STR (%)	0,53	0,06	0,94
LIN (%)	0,77	0,22	0,97
MOTILIDADE (%)	<,0001	0,46	0,25
PROGRESSIVOS (%)	<,0001	0,68	0,18
RÁPIDOS (%)	<,0001	0,57	0,23
MÉDIOS (%)	<,0001	0,21	0,30
LENTOS (%)	0,04	0,65	0,35
IMÓVEIS (%)	<,0001	0,53	0,65
ML (%)	0,02	0,19	0,69
ALML (%)	0,07	0,26	0,97
AL (%)	0,56	0,35	0,69
AIMI (%)	0,0008	0,94	0,87
EOX+MI (%)	0,01	0,51	0,94
DABI (%)	0,30	0,13	0,30
DABII (%)	0,50	0,24	0,41
DABIII (%)	0,22	0,11	0,51
DABIV (%)	0,54	0,16	0,13
TBARS (ng/10⁶ sptz)	0,24	0,48	0,06
JC-1 (%)	0,06	0,006	0,01
SCSA (%)	<,0001	0,20	0,08

Tabela 4 - Efeito das diferentes concentrações de carnosina nas variáveis de espermatozoides criopreservados de equinos – São Paulo – 2017

	Controle	Carnosina 1mM	Carnosina 50mM	Carnosina 100mM
VAP (μ/s)	68,14 ± 3,86	70,08 ± 2,89	75,36 ± 4,00	77,23 ± 3,84
VSL (μ/s)	52,63 ± 3,12	55,87 ± 2,57	52,85 ± 3,26	53,52 ± 2,70
VCL (μ/s)	130,29 ± 6,60	129,91 ± 5,93	142,32 ± 6,49	145,29 ± 8,10
ALH (μm/s)	6,19 ± 0,27 ^{bc}	6,02 ± 0,21 ^c	6,79 ± 0,25 ^b	7,52 ± 0,26 ^a
BCF (Hz)	42,47 ± 0,79	43,21 ± 0,96	41,77 ± 0,55	41,03 ± 0,82
STR (%)	73,93 ± 1,40 ^{ab}	77,64 ± 1,51 ^a	70,57 ± 1,73 ^b	71,14 ± 2,38 ^b
LIN (%)	42,64 ± 1,84 ^{ab}	46,43 ± 2,10 ^a	40,57 ± 1,40 ^b	41,21 ± 2,33 ^{ab}
MOTILIDADE (%)	31,79 ± 4,82	28,29 ± 2,82	36,29 ± 3,85	30,71 ± 3,91
PROGRESSIVOS (%)	10,46 ± 2,09	11,64 ± 1,63	11,71 ± 1,77	9,50 ± 1,31
RÁPIDOS (%)	14,85 ± 3,07	15,14 ± 2,02	20,43 ± 2,67	16,71 ± 2,08
MÉDIOS (%)	15,31 ± 1,47	13,21 ± 1,58	16,00 ± 2,06	12,15 ± 1,91
LENTOS (%)	33,64 ± 2,88	33,07 ± 3,68	35,21 ± 3,24	37,21 ± 2,81
IMÓVEIS (%)	34,64 ± 5,16	38,50 ± 4,28	28,50 ± 4,14	31,93 ± 3,40
ML (%)	38,26 ± 1,71 ^a	34,26 ± 2,05 ^{ab}	29,12 ± 1,95 ^b	32,95 ± 2,69 ^{ab}
ALML (%)	26,61 ± 1,97	28,48 ± 2,71	31,68 ± 2,21	31,92 ± 2,37
AL (%)	1,70 ± 0,21	1,80 ± 0,19	1,75 ± 0,17	1,33 ± 0,15
AIMI (%)	33,45 ± 2,65	35,48 ± 2,48	37,34 ± 2,66	33,76 ± 3,33
EOx⁺MI (%)	19,33 ± 3,51	15,33 ± 1,66	16,12 ± 3,24	15,31 ± 2,31
DAB I (%)	63,79 ± 2,89 ^a	58,57 ± 2,34 ^{ab}	58,54 ± 2,41 ^{ab}	55,43 ± 2,04 ^b
DAB II (%)	25,07 ± 2,18 ^b	27,86 ± 2,34 ^{ab}	29,21 ± 1,87 ^{ab}	31,57 ± 2,05 ^a
DAB III (%)	4,64 ± 0,87 ^b	6,50 ± 1,00 ^{ab}	6,86 ± 1,11 ^a	7,50 ± 0,92 ^a
DAB IV (%)	6,57 ± 1,23	7,07 ± 1,37	7,79 ± 0,97	4,93 ± 0,94

Tabela 5 – Efeito da carnosina (0 e 50mM), do piruvato (0 e 5mM) e da interação carnosina * piruvato nas variáveis avaliadas pela análise espermática computadorizada (CASA), na análise concomitante da integridade de membrana plasmática e acrossomo, na avaliação do *status* oxidativo, função mitocondrial e integridade de DNA de amostras com alta congelabilidade – São Paulo –2017.

	Carnosina	Piruvato	Carnosina*Piruvato
VAP (μ/s)	0,48	0,13	0,18
VSL (μ/s)	0,87	0,12	0,09
VCL (μ/s)	0,79	0,25	0,32
ALH (μm/s)	0,87	0,55	0,69
BCF (Hz)	0,45	0,25	0,82
STR (%)	0,54	0,43	0,94
LIN (%)	0,71	0,86	0,94
MOTILIDADE (%)	0,90	0,97	0,71
PROGRESSIVOS (%)	0,72	0,77	0,81
RÁPIDOS (%)	0,83	0,45	0,95
MÉDIOS (%)	0,82	0,09	0,16
LENTOS (%)	0,09	0,23	0,51
IMÓVEIS (%)	0,24	0,19	0,99
ALMI (%)	0,92	0,23	0,22
ALML (%)	0,16	0,22	0,87
AIML (%)	0,53	0,28	0,42
AIMI (%)	0,51	0,77	0,24
EOX+MI (%)	0,39	0,84	0,52
DABI (%)	0,36	0,02	0,70
DABII (%)	0,01	0,17	0,93
DABIII (%)	0,26	0,00	0,69
DABIV (%)	0,06	0,40	0,44
SCSA (%)	0,93	0,88	0,48
TBARS (ng/106 spz)	0,66	0,46	0,11
JCA (%)	0,94	0,20	0,25
JCB (%)	0,95	0,29	0,25
JCI (%)	0,66	0,77	0,67

Tabela 6 – Efeito da carnosina (0 e 50mM), do piruvato (0 e 5mM) e da interação carnosina * piruvato nas variáveis avaliadas pela análise espermática computadorizada (CASA), na análise concomitante da integridade de membrana plasmática e acrossomo, na avaliação do *status* oxidativo, função mitocondrial e integridade de DNA de amostras com baixa congelabilidade – São Paulo –2017.

	Carnosina	Piruvato	Carnosina*Piruvato
VAP (μ/s)	0,12	0,54	0,58
VCL (μ/s)	0,46	0,75	0,72
ALH (μm/s)	0,87	0,85	0,84
BCF (Hz)	0,45	0,84	0,20
STR (%)	0,99	0,13	0,27
LIN (%)	0,83	0,22	0,32
MOTILIDADE (%)	0,03	0,39	0,66
PROGRESSIVOS (%)	0,03	0,58	0,12
RÁPIDOS (%)	0,01	0,72	0,89
MÉDIOS (%)	0,58	0,44	0,33
LENTOS (%)	0,99	0,35	0,21
IMÓVEIS (%)	0,51	0,31	0,22
ALMI (%)	0,29	0,64	0,98
ALML (%)	0,84	0,60	0,42
AIML (%)	0,95	0,80	0,68
AIMI (%)	0,85	0,45	0,41
EOX ⁺ MI (%)	0,32	0,16	0,32
DABII (%)	0,09	0,07	0,77
DABIII (%)	0,11	0,01	0,38
SCSA (%)	0,53	0,85	0,99
TBARS (ng/10 ⁶ sptz)	0,32	0,70	0,69
JCA (%)	0,40	0,51	0,29
JCB (%)	0,29	0,98	0,85
JCI (%)	0,23	0,31	0,13
VSL (μm/s)	0,16	0,08	0,07
DABI (%)	0,81	0,51	0,04
DABIV (%)	0,02	0,00	0,02

Tabela 7 - Efeito do piruvato (5mM) nas variáveis em amostras criopreservadas de equinos com baixa congelabilidade – São Paulo – 2017

	Controle	Piruvato 5mM	P
VAP (μ/s)	64,09±4,58	66,49±5,69	0,75
VCL (μ/s)	133,40±10,67	128,17±9,70	0,73
ALH (μm/s)	6,70±0,58	6,57±0,77	0,83
BCF (Hz)	37,72±2,07	37,73±1,50	1,00
STR (%)	66,44±4,15	74,00±3,41	0,18
LIN (%)	34,00±2,77	38,38±2,71	0,28
MOTILIDADE (%)	21,22±2,84	17,89±1,82	0,35
PROGRESSIVOS (%)	6,67±1,14	6,56±1,08	0,94
RÁPIDOS (%)	11,22±2,19	9,67±1,13	0,72
MÉDIOS (%)	9,78±1,37	8,33±1,65	0,43
LENTOS (%)	46,44±5,72	39,89±7,52	0,50
IMÓVEIS (%)	32,56±7,25	42,00±8,19	0,40
AIML (%)	51,57±2,86	52,65±2,53	0,78
ALML (%)	38,48±2,64	36,42±2,38	0,57
ALMI (%)	1,95±0,24	1,78±0,19	0,69
AIMI (%)	7,99±1,04	9,14±0,94	0,42
JCA (%)	12,20±1,61	13,80±1,28	0,46
JCB (%)	78,67±2,25	78,47±1,45	0,94
JCI (%)	9,12±0,99	7,73±0,75	0,38
SCSA (%)	94,51±0,72	94,78±0,61	0,77
EOx⁺MI (%)	7,83±1,28	5,78±0,68	0,18
EOx⁺ML (%)	8,05±1,41	7,93±1,51	0,98
EOx⁻ML (%)	81,33±2,31	83,18±1,46	0,51
EOx⁻MI (%)	2,81±0,40	3,11±0,49	0,64
TBARS (ng/10⁶ sptz)	14,87±3,36	18,42±4,54	0,54
DABII (%)	21,11±3,46	13,00±1,90	0,06
DABIII (%)	13,44±0,85	7,11±1,67	0,01

Tabela 8 -Efeito da carnosina (50mM) nas variáveis de espermatozoides criopreservados de equinos com baixa congelabilidade – São Paulo – 2017

	Controle	Carnosina (50mM)	P
VAP (μ/s)	60,85 \pm 3,69	72,26 \pm 6,57	0,12
VCL (μ/s)	126,01 \pm 8,93	138,29 \pm 11,63	0,40
ALH (μm/s)	6,69 \pm 0,70	6,54 \pm 0,55	0,93
BCF (Hz)	36,88 \pm 1,92	39,06 \pm 1,04	0,41
STR (%)	70,73 \pm 2,74	69,43 \pm 5,98	0,83
LIN (%)	37,00 \pm 2,21	34,33 \pm 4,00	0,53
MOTILIDADE (%)	16,45 \pm 1,19	24,43 \pm 3,24	0,02
PROGRESSIVOS (%)	5,36 \pm 0,70	8,57 \pm 1,38	0,04
RÁPIDOS (%)	8,00 \pm 0,73	14,29 \pm 2,30	0,00
MÉDIOS (%)	8,45 \pm 1,11	10,00 \pm 2,15	0,72
LENTOS (%)	42,55 \pm 6,00	44,14 \pm 7,96	0,87
IMÓVEIS (%)	40,91 \pm 6,37	31,57 \pm 9,97	0,42
AIML (%)	52,18 \pm 2,84	51,97 \pm 2,63	0,96
ALML (%)	37,17 \pm 2,69	37,87 \pm 2,42	0,85
ALMI (%)	1,98 \pm 0,18	1,77 \pm 0,26	0,29
AIMI (%)	8,66 \pm 0,78	8,39 \pm 1,21	0,85
JCA (%)	13,81 \pm 1,38	12,05 \pm 1,58	0,41
JCB (%)	77,06 \pm 1,53	80,10 \pm 2,24	0,27
JCI (%)	9,13 \pm 0,82	7,84 \pm 0,99	0,23
SCSA (%)	95,36 \pm 0,53	93,91 \pm 0,75	0,12
EOx⁺MI (%)	6,09 \pm 0,86	7,92 \pm 1,32	0,24
EOx⁺ML (%)	7,66 \pm 1,21	8,51 \pm 1,84	0,83
EOx⁻ML (%)	83,17 \pm 1,24	80,81 \pm 2,93	0,41
EOx⁻MI (%)	3,08 \pm 0,44	2,77 \pm 0,42	0,68
TBARS (ng/10⁶ sptz)	19,12 \pm 3,68	12,76 \pm 4,06	0,28
DABII (%)	13,91 \pm 2,28	22,00 \pm 3,67	0,06
DABIII (%)	8,82 \pm 1,68	12,57 \pm 1,23	0,13

5 CONCLUSÃO

Pudemos concluir no primeiro experimento, que a terapia espermática com o dipeptídeo carnosina durante a criopreservação de amostras seminais de alta congelabilidade não apresenta efeitos significativos. No entanto, quando utilizada em espermatozoides provenientes de amostras com baixa congelabilidade na dose de 50mM e 100mM, observamos proteção parcial da membrana plasmática e DNA, respectivamente. Por outro lado, pode ter gerado um possível comprometimento mitocondrial levando ao aumento da suscetibilidade à peroxidação lipídica.

Ademais, o efeito sinérgico da carnosina (50mM) e do piruvato (5mM) parece auxiliar na homeostase oxidativa, evitando uma maior suscetibilidade do espermatozoide ao estresse oxidativo. Ainda, essa associação atua na manutenção da velocidade progressiva e atividade mitocondrial. Portanto, apesar de poucos estudos a respeito do possível efeito sinérgico entre a carnosina e o piruvato na função espermática, a terapia espermática com associação destas moléculas durante o processo de criopreservação parece ser promissora.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; SAID, T. M. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis in male infertility: a clinical approach. **BJU International**, v. 95, n. 4, p. 503-507, 2005.
- AGARWAL, A.; VIRK, G.; ONG, C.; DU PLESSIS, S. S. Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. **World J Mens Health**, v. 32, n. 1, p. 1-17, 2014.
- AITKEN, R. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, n. 4, p. 659-668, 1995.
- AITKEN, R. J.; GIBB, Z.; BAKER, M. A.; DREVET, J.; GHARAGOZLOO, P. Causes and consequences of oxidative stress in spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 2, p. 1-10, 2015.
- ALVARENGA, M.; LEAO, K.; PAPA, F.; LANDIM-ALVARENGA, F.; MEDEIROS, A.; GOMES, G. The use of alternative cryoprotectors for freezing stallion semen. **Havemeyer Foundation Monograph Series**, v. 12, n., p. 74-76, 2004.
- ALVARENGA, M.; NETO, C. R.; PAPA, F. O. Estratégias para melhorar a qualidade e fertilidade do sêmen de reprodutores equinos. v., n., p., 2014.
- ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; RAMIRES NETO, C. Advances in Stallion Semen Cryopreservation. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 32, n. 3, p. 521-530, 2016.
- ANDRADE, E.; MELO-STERZA, F.; SENEDA, M.; ALFIERI, A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 34, n., p. 79-85, 2010.
- APARICIO, I. M.; MARTIN MUÑOZ, P.; SALIDO, G. M.; PEÑA, F. J.; TAPIA, J. A. The autophagy-related protein LC3 is processed in stallion spermatozoa during short-and long-term storage and the related stressful conditions. **animal**, v. 10, n. 7, p. 1182-1191, 2016.
- AURICH, J. E.; SCHÖNHERR, U.; HOPPE, H.; AURICH, C. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. **Theriogenology**, v. 48, n. 2, p. 185-192, 1997.
- BAILEY, J. L.; BILODEAU, J.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**, v. 21, n. 1, p. 1-7, 2000.
- BALL, B. A.; VO, A. T.; BAUMBER, J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 4, p. 508-515, 2001.
- 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. 257-267, 2008.
- BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S. L. D.; SEARA, L. T. Dietetics advanced glycation end-products and chronic complications of diabetes. **Revista de Nutrição**, v. 22, n. 1, p. 113-124,

2009.

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, n. 4, p. 621-628, 2003.

BOLDYREV, A. A.; ALDINI, G.; DERAIVE, W. Physiology and pathophysiology of carnosine. **Physiological reviews**, v. 93, n. 4, p. 1803-1845, 2013.

BONNES-TAOUREL, D.; GUÉRIN, M.-C.; TORREILLES, J. Is malonaldehyde a valuable indicator of lipid peroxidation? **Biochemical pharmacology**, v. 44, n. 5, p. 985-988, 1992.

BRANHAM, M. L.; SINGH, P.; BISETTY, K.; SABELA, M.; GOVENDER, T. Preparation, spectrochemical, and computational analysis of L-carnosine (2-[(3-aminopropanoyl) amino]-3-(1H-imidazol-5-yl) propanoic acid) and its ruthenium (II) coordination complexes in aqueous solution. **Molecules**, v. 16, n. 12, p. 10269-10291, 2011.

CHENG, J.; WANG, F.; YU, D.-F.; WU, P.-F.; CHEN, J.-G. The cytotoxic mechanism of malondialdehyde and protective effect of carnosine via protein cross-linking/mitochondrial dysfunction/reactive oxygen species/MAPK pathway in neurons. **European journal of pharmacology**, v. 650, n. 1, p. 184-194, 2011.

COCCHIA, N.; PASOLINI, M. P.; MANCINI, R.; PETRAZZUOLO, O.; CRISTOFARO, I.; ROSAPANE, I.; SICA, A.; TORTORA, G.; LORIZIO, R.; PARAGGIO, G.; MANCINI, A. Effect of sod (superoxide dismutase) protein supplementation in semen extenders on motility, viability, acrosome status and ERK (extracellular signal-regulated kinase) protein phosphorylation of chilled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 75, n. 7, p. 1201-1210, 2011.

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

DE LAMIRANDE, E. V. E.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 13, n. 5, p. 379-386, 1992.

DI PIERRO, F.; BERTUCCIOLI, A.; BRESSAN, A.; RAPACIOLI, G. Carnosine-based supplement. **Nutrafoods**, v. 10, n. 2-3, p. 43-47, 2011.

DUCCI, M.; PACCHINI, S.; NICCOLINI, A.; VIALE, A.; GAZZANO, A.; MARTELLI, F.; GADEA, J. Poster Abstracts - Quantitative Determination of Imidazole Dipeptides in Stallion Spermatozoa and Seminal Plasma. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, n. 4, p. 379-379, 2005.

DUCCI, M.; PACCHINI, S.; NICCOLINI, A.; GAZZANO, A.; CERRI, D.; GADEA, J.; BOBOWIEC, R.; SIGHIERI, C.; MARTELLI, F. Concentrations of carnosine, anserine, L-histidine and 3-methyl histidine in boar spermatozoa and sheep milk by a modified HPLC method. **Polish journal of veterinary sciences**, v. 9, n. 3, p. 159-163, 2006.

DUNNETT, M.; HARRIS, R. C.; DUNNETT, C. E.; HARRIS, P. A. Plasma carnosine concentration: diurnal variation and effects of age, exercise and muscle damage. **Equine**

Veterinary Journal, v. 34, n. S34, p. 283-287, 2002.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n., p. 61-68, 1997.

GARIBALLA, S. E.; SINCLAIR, A. J. Carnosine: physiological properties and therapeutic potential. **Age and Ageing**, v. 29, n. 3, p. 207-210, 2000.

GIBB, Z.; BUTLER, T. J.; MORRIS, L. H. A.; MAXWELL, W. M. C.; GRUPEN, C. G. Quercetin improves the postthaw characteristics of cryopreserved sex-sorted and nonsorted stallion sperm. **Theriogenology**, v. 79, n. 6, p. 1001-1009, 2013.

GIBB, Z.; AITKEN, R. J. The Impact of Sperm Metabolism during In Vitro Storage: The Stallion as a Model. **BioMed Research International**, v. 2016, n., p. 8, 2016.

GIBB, Z.; LAMBOURNE, S. R.; AITKEN, R. J. The Paradoxical Relationship Between Stallion Fertility and Oxidative Stress. *Biology of reproduction*, v. 91, n. 3, p. Article 77, 71-10, 2014.

GUIOTTO, A.; RUZZA, P.; BABIZHAYEV, M. A.; CALDERAN, A. Malondialdehyde scavenging and aldose-derived Schiff bases' transglycation properties of synthetic histidyl-hydrazide carnosine analogs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 18, p. 6158-6163, 2007.

GULEWITSCH, W.; AMIRADŽIBI, S. Ueber das Carnosin, eine neue organische Base des Fleischextractes. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 33, n. 2, p. 1902-1903, 1900.

HIPKISS, A. R.; MICHAELIS, J.; SYRRIS, P. Non-enzymatic glycosylation of the dipeptide l-carnosine, a potential anti-protein-cross-linking agent. **FEBS Letters**, v. 371, n. 1, p. 81-85, 1995.

HIPKISS, A. R.; PRESTON, J. E.; HIMSWORTH, D. T. M.; WORTHINGTON, V. C.; ABBOT, N. J. Protective effects of carnosine against malondialdehyde-induced toxicity towards cultured rat brain endothelial cells. **Neuroscience Letters**, v. 238, n. 3, p. 135-138, 1997.

HIPKISS, A. R.; WORTHINGTON, V. C.; HIMSWORTH, D. T. J.; HERWIG, W. Protective effects of carnosine against protein modification mediated by malondialdehyde and hypochlorite. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1380, n. 1, p. 46-54, 1998.

HIPKISS, A. R. Carnosine, a protective, anti-ageing peptide? **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 30, n. 8, p. 863-868, 1998.

HIPKISS, A. R.; BAYE, E.; DE COURTEN, B. Carnosine and the processes of ageing. **Maturitas**, v. 93, n., p. 28-33, 2016.

HOLLIDAY, R.; MCFARLAND, G. A. Inhibition of the growth of transformed and neoplastic

cells by the dipeptide carnosine. **British Journal of Cancer**, v. 73, n. 8, p. 966-971, 1996.

IBGE. (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). **Produção da Pecuária Municipal em 2014**, v. 42, n. p. 39, 2014. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2014_v42_br.pdf>. Acesso em: 09 Maio 2016.

JONES, R. Comparative biochemistry of mammalian epididymal plasma. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, v. 61, n. 3, p. 365-370, 1978.

KAWAI, G.; GURGEL, J.; LOSANO, J.; DALMAZZO, A.; ROCHA, C.; TSUNODA, R.; GÓES, P.; RUI, B.; ANGRIMANI, D.; ASSUMPÇÃO, M. Susceptibility of stallion spermatozoa to different oxidative challenges: role of seminal plasma. *Journal of Equine Veterinary Science*, v., n., p., 2017.

KO, E. Y.; SABANEHGH, E. S., JR.; AGARWAL, A. Male infertility testing: reactive oxygen species and antioxidant capacity. **Fertility and Sterility**, v. 102, n. 6, p. 1518-1527, 2014.

LIMA, R. A. D. S.; CINTRA, A. G. **Revisão do estudo do complexo do agronegócio do cavalo**. Brasília: Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil, 2016.

LOOMIS, P. R.; GRAHAM, J. K. Commercial semen freezing: Individual male variation in cryosurvival and the response of stallion sperm to customized freezing protocols. *Animal Reproduction Science*, v. 105, n. 1-2, p. 119-128, 2008.

LUIZ, E. A. **Paz & Renovação**, 2010. 224 p.

LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, n., p. 164-175, 2014.

MAIA, M.; BICUDO, S. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte**, v. 33, n. 4, p. 183-193, 2009.

MORAES, E. A.; MATOS, W. C. G.; GRAHAM, J. K.; FERRARI JR, W. D. Cholestanol-loaded-cyclodextrin improves the quality of stallion spermatozoa after cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 158, n., p. 19-24, 2015.

NAGARAJ, R. H.; SHIPANOVA, I. N.; FAUST, F. M. Protein Cross-linking by the Maillard Reaction: isolation, characterization, and in vivo detection of a lysine-lysine cross-link derived from methylglyoxal. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 32, p. 19338-19345, 1996.

NEELOFAR, K.; AHMAD, J. Amadori albumin in diabetic nephropathy. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v. 19, n. 1, p. 39-46, 2015.

NICHI, M. **Sistemas de proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídios seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de Dourados, MS**. Universidade de São Paulo, 2003.

NICHI, M.; BOLS, P. E. J.; ZÜGE, R. M.; BARNABE, V. H.; GOOVAERTS, I. G. F.; BARNABE, R. C.; CORTADA, C. N. M. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. **Theriogenology**, v. 66, n. 4, p. 822-828, 2006.

NICHI, M.; GOOVAERTS, I.; CORTADA, C.; BARNABE, V.; DE CLERCQ, J.; BOLS, P. Roles of lipid peroxidation and cytoplasmic droplets on in vitro fertilization capacity of sperm collected from bovine epididymides stored at 4 and 34 C. **Theriogenology**, v. 67, n. 2, p. 334-340, 2007.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system1. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.

OLACIREGUI, M.; GIL, L.; MONTÓN, A.; LUÑO, V.; JEREZ, R. A.; MARTÍ, J. I. Cryopreservation of epididymal stallion sperm. **Cryobiology**, v. 68, n. 1, p. 91-95, 2014.

PEÑA, F. J.; PLAZA DAVILA, M.; BALL, B. A.; SQUIRES, E. L.; MARTIN MUÑOZ, P.; ORTEGA FERRUSOLA, C.; BALAO DA SILVA, C. The Impact of Reproductive Technologies on Stallion Mitochondrial Function. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 4, p. 529-537, 2015.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, n., p. 55-74, 2015.

RICH, G.; MCGLOTHLIN, D.; LEWIS, L.; SQUIRES, E.; PICKETT, B. Effect of vitamin E supplementation on stallion seminal characteristics and sexual behavior. In: 10. international congress on animal reproduction and artificial insemination, University of Illinois (USA), 10-14 Jun 1984, 1984 - University of Illinois at Urbana-Champaign, p.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, NAVDEEP S. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. **Current Biology**, v. 24, n. 10, p. R453-R462, 2014.

SHAO, L.; LI, Q.-H.; TAN, Z. L-carnosine reduces telomere damage and shortening rate in cultured normal fibroblasts. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 324, n. 2, p. 931-936, 2004.

SIKKA, S. C. Andrology Lab Corner*: Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Andrology and Assisted Reproductive Technology. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 1, p. 5-18, 2004.

SILVA, E. C. B.; GUERRA, M. M. P. Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio: produção e efeitos sobre a integridade estrutural e funcional dos espermatozoides. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 13, n. p. 9-16, 2010. Disponível em: <http://www.rcvt.org.br/volume13/Volume%2013_%202010%20de%209%20a%2016%20_Esp%20C3%A9cies%20Reativas.pdf>. Acesso em: 13/02/2015.

THOMSON, L. K.; FLEMING, S D.; AITKEN, R. J.; DE IULIIS, G. N.; ZIESCHANG, J.-A.; CLARK, A. M. Cryopreservation-induced human sperm DNA damage is predominantly mediated by oxidative stress rather than apoptosis. **Human Reproduction**, v. 24, n. 9, p. 2061-2070, 2009.

THORPE, S.; BAYNES, J. Role of the Maillard Reaction in Diabetes Mellitus and Diseases of Aging. **Drugs & Aging**, v. 9, n. 2, p. 69-77, 1996.

TORREGGIANI, M. T., A. Hydroxyl radical scavenging by carnosine and Cu (II)-carnosine complexes: a pulse-radiolysis and spectroscopic study. **International journal of radiation biology**, v. 75, n. 9, p. 1177-1188, 1999.

VASCONCELOS FRANCO, J. S.; CHAVEIRO, A.; GÓIS, A.; MOREIRA DA SILVA, F. Effects of α -tocopherol and Ascorbic Acid on Equine Semen Quality after Cryopreservation. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 10, p. 787-793, 2013.