

ÁLVARO DE MIRANDA ALVES

**Terapias mitocondriais para a prevenção do estresse oxidativo durante
a criopreservação espermática em bovinos**

São Paulo

2023

ÁLVARO DE MIRANDA ALVES

**Terapias mitocondriais para a prevenção do estresse oxidativo durante a
criopreservação espermática em bovinos**

VERSÃO CORRIGIDA

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

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Marcilio Nichi

Co-orientador:

João Diego de Agostini Losano

São Paulo

2023

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

Catálogo na Publicação

Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo
Ficha catalográfica gerada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Alves, Álvaro de Miranda
Terapias mitocondriais para a prevenção do estresse oxidativo durante a criopreservação espermática em bovinos / Álvaro de Miranda Alves ; orientador Marcilio Nichi ; coorientador João Diego de Agostini Losano.-- São Paulo, 2023.
71 f. : il.

Dissertação (Mestrado em ciências - Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal- Departamento de Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2023.

1. GSH. 2. MitoTEMPO. 3. Estresse redutivo. 4. Antioxidantes. 5. Espécies reativas de oxigênio. I. Título.

Bibliotecária responsável pela estrutura de catalogação na publicação: Maria Aparecida Laet - CRB 5673-8.



Comissão de Ética no Uso de Animais

São Paulo, 01 de março de 2023
CEUAX N 3476151222

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Marcilio Nichi

Área: Reprodução Animal

Equipe envolvida: Álvaro De Miranda Alves - (pós-graduando);

Título da proposta: "Terapias mitocondriais para a prevenção do estresse oxidativo durante a criopreservação espermática em bovinos".

Parecer Consubstanciado da CEUA FMVZ

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo, na reunião de 08/02/2023, **ANALISOU** e **APROVOU** a proposta acima referenciada. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da proposta.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão da proposta.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo



*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

São Paulo, 1st March 2023

CERTIFIED

We certify that the proposal entitled: "*Mitochondrial therapies on the prevention of oxidative stress during sperm cryopreservation in bulls*", protocol number CEUAX 3476151222 (ID 002453), under the responsibility Marcilio Nichi, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo), and was approved in the meeting of day February 08, 2023.

Certificamos que a proposta intitulada: "*Terapias mitocondriais para a prevenção do estresse oxidativo durante a criopreservação espermática em bovinos*", protocolado sob o CEUAX nº 3476151222, sob a responsabilidade de Marcilio Nichi, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 08 de fevereiro de 2023.

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

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

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: Alves, Álvaro de Miranda

Título: Terapias mitocondriais para a prevenção do estresse oxidativo durante a criopreservação espermática em bovinos

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

Data ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico,

Aos meus pais, Neide e Flávio, meus exemplos de amor, carinho, integridade, responsabilidade, profissionalismo e caráter. Tudo que realizei e conquistei até hoje só foi possível pelo suporte e educação que me deram. Se hoje estou realizando esse sonho vocês são os responsáveis.

Aos meus irmãos, Isabela, Arthur e Lívia, por me ensinarem tanto, mesmo sem perceberem. Vocês me ensinaram o que é ser irmão e me impulsionaram a buscar minha melhor versão.

Aos meus avós, que deram início a essa família maravilhosa que tenho hoje.

AGRADECIMENTOS

Mais uma fase que se encerra. Muita coisa aconteceu, sobrevivemos uma pandemia (ufa!), amizades foram criadas, fortalecidas, outras se tornaram mais distantes, mas nunca esquecidas. Muito trabalho e aprendizado, mas nunca sem deixar de aproveitar. São tantas pessoas que participaram da minha trajetória que fica difícil agradecer nesse pequeno espaço, mas a todos vocês e aqueles que por ventura esqueça de citar, muito obrigado!

Não teria como começar agradecendo outra pessoa a não ser nosso querido professor Marcilio, dono de um coração gigante, que me recebeu lá em 2018 pra fazer um estágio e desde então eu não quis mais sair daqui. Obrigado por ter aberto as portas da pesquisa pra mim, por ter me ensinado tanto e com tanta atenção e paciência. É uma honra tê-lo como orientador e amigo. O senhor é uma inspiração pessoal e profissional. Muito Obrigado!

Ao Diego, um grande amigo e o eterno chefinho do LA, por toda ajuda, ensinamentos, risadas e amizade. Assim como o prof. Marcilio, você me abriu as portas e me encaminhou para a ciência. Muito obrigado!

Aos meus companheiros de laboratório e grandes amigos, Bobbie, Rapha, Henrique, Ken e Fábio. Só vocês sabem os perrengues que passamos juntos, mas tudo foi mais fácil por causa de vocês. Cada risada, cada churrasco e cada ideia maluca fez os dias parecerem mais um hobby e menos um trabalho, até aquaristas viramos!

À Lara, pelo carinho e companheirismo, por ter me dado suporte nos meus momentos de estresse e comemorado minhas conquistas. Cada dia com você torna minha vida mais leve e especial.

Aos amigos do VRA, Beto, Laís, Felipe, por todos os momentos de alegria que me proporcionaram.

À Camilla e Larissa, por toda ajuda não só no experimento, mas em tudo que precisei enquanto estive aqui.

À Harumi, sem você não sei como o PPGRA iria funcionar. Obrigado pelas conversas, orientação, pela ajuda e por me aturar esse tempo todo.

À minha amiga Rafaella, por estar do meu lado durante meus altos e baixos, sempre me aconselhando e sendo a melhor amiga que eu poderia ter. Você é o exemplo de cientista que um dia eu quero ser.

Ao Ivo pelas risadas e amizade nesses anos.

Ao Biosptz pelas análises no citômetro.

À todo corpo docente da FMVZ-USP, em especial aos docentes do VRA, pelos ensinamentos e oportunidades que me proporcionaram.

Aos funcionários do VRA, pela ajuda fundamental no dia a dia.

À Seleon Biotecnologia, especialmente a Patricia, Zé Roberto e Bruno, pela oportunidade de realizar esse experimento em parceria, ainda mais quando ele teve que ser repetido pela perda das amostras. Muito obrigado também a toda equipe da central pelo apoio prestado.

À FMVZ, pelos 8 anos me proporcionando experiências maravilhosas e pelo desenvolvimento pessoal e profissional que me proporcionou.

À IMV Technologies pelas palhetas doadas para realização deste estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa para a realização deste estudo, processo 132202/2021-2.

“If something makes you sad when it ends, it must have been pretty wonderful when it was happening”

This is us

RESUMO

ALVES, A. M. **Terapias mitocondriais para a prevenção do estresse oxidativo durante a criopreservação espermática em bovinos** [Mitochondrial therapies on the prevention of oxidative stress during sperm cryopreservation in bulls]. 2023. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

A criopreservação espermática é considerada um processo - chave para o uso das biotecnologias reprodutivas em bovinos, como inseminação artificial e produções *in vivo* e *in vitro* de embriões. No entanto, tal técnica causa redução da qualidade espermática, sendo o estresse oxidativo um dos principais mecanismos envolvidos em injúrias espermáticas pós-descongelamento. Neste contexto, acredita-se que a mitocôndria possua um papel central no desequilíbrio oxidativo durante a criopreservação espermática, por ser a principal fonte liberadora de espécies reativas de oxigênio (EROS). Assim, uma possível alternativa para melhorar a qualidade espermática pós-criopreservação seria uma terapia específica tendo como alvo essa organela, visando reduzir a liberação excessiva de EROS neste processo. Uma molécula promissora seria o MitoTEMPO que é capaz de quelar metais de transição responsáveis pela reação de Fenton, prevenindo a geração do radical hidroxila. Além disso, esta molécula possui papel na matriz mitocondrial com ação mimética de superóxido dismutase, o que, no entanto, pode levar a um acúmulo de peróxido de hidrogênio. Desta forma uma associação com mecanismos voltados ao peróxido de hidrogênio seria necessária (e.g., GSH). Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar se o tratamento com o protetor mitocondrial MitoTEMPO, associado ou não à GSH, é capaz de prevenir a produção excessiva de EROS por meio da proteção e manutenção da função mitocondrial, melhorando aspectos quantitativos e qualitativos espermatozoides criopreservados de bovinos. Para tanto, ejaculados de 17 touros (N=17) foram submetidos a criopreservação com diluidores suplementados com diferentes concentrações dos antioxidantes supracitados. Cada ejaculado foi dividido em 8 alíquotas, contendo concentrações crescentes da molécula MitoTEMPO (0, 25, 50 e 100 μM) com ou sem GSH (0 e 5 mM). Após a diluição de cada ejaculado nos meios contendo seus respectivos tratamentos antioxidantes, as amostras foram submetidas à criopreservação, descongelamento e avaliação espermática. Observamos que as amostras, quando suplementadas em associação com GSH, apresentaram uma piora na de atividade mitocondrial (teste DAB), em algumas características da cinética espermática, como

motilidade total, ALH e linearidade, e integridade de membranas plasmática e acrossomal. A suplementação somente com o MitoTEMPO não apresentou melhoras significativas na qualidade espermática após a descongelação. Os resultados do presente estudo indicam que a suplementação com MitoTEMPO e GSH nas doses utilizadas, associados ou não, não melhoram a qualidade espermática após a descongelação.

Palavras chave: GSH. MitoTEMPO. Estresse redutivo. Antioxidantes. Espécies reativas de oxigênio.

ABSTRACT

ALVES, A. M. **Mitochondrial therapies on the prevention of oxidative stress during sperm cryopreservation in bulls** [Terapias mitocondriais para a prevenção do estresse oxidativo durante a criopreservação espermática em bovinos]. 2023. 71 f. Dissertation (Masters in Science) – School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2023.

Sperm cryopreservation is considered a key process for logistics of other biotechniques in bulls, such as artificial insemination and *in vivo* and *in vitro embryo* production. However, such a technique reduces sperm quality, oxidative stress being one of the main mechanisms involved in post-thaw sperm injuries. In this context, it is believed that mitochondria play a central role in oxidative imbalance during sperm cryopreservation, as it is the main source of reactive oxygen species (ROS). Thus, a possible alternative to improve post-cryopreservation sperm quality would be a specific therapy targeting this organelle, aiming to reduce the excessive release of ROSs in this process. A promising molecule would be MitoTEMPO, which is capable of chelating transition metals responsible for the Fenton reaction, preventing the generation of the hydroxyl radical. In addition, this molecule plays a role in the mitochondrial matrix with mimetic action of superoxide dismutase, which, however, can lead to an accumulation of hydrogen peroxide. Thus, an association with mechanisms aiming hydrogen peroxide would be necessary (e.g., GSH). Therefore, the objective of the present study was to assess whether treatment with the mitochondrial protector MitoTEMPO, associated or not with GSH, is able to prevent the excessive production of ROS through the protection and maintenance of mitochondrial function, improving quantitative and qualitative aspects of cryopreserved sperm in bull. Towards this aim, ejaculates of 17 bulls (N = 17) were subjected to cryopreservation with extenders supplemented with different concentrations of the aforementioned antioxidants. Each ejaculate was divided into 8 aliquots, containing increasing concentrations of MitoTEMPO (0, 25, 50 and 100 μ M) with or without GSH (0 and 5 mM). After diluting each ejaculate in the media containing their respective antioxidant treatments, the samples were subjected to cryopreservation, thawing and sperm analysis. We observed that the samples, when supplemented in association with GSH, showed a deleterious effect on mitochondrial activity (DAB test), in some characteristics of sperm kinetics, such as total motility, ALH and linearity, and integrity of plasmatic and acrosomal membranes. Supplementation with MitoTEMPO alone did

not show significant improvements in sperm quality after thawing. The results of the present study indicate that supplementation with MitoTEMPO and GSH at the doses used, associated or not, do not improve sperm quality after thawing.

Keywords: GSH. MitoTEMPO. Reductive stress. Antioxidants. Reactive oxygen species.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Reação em cascata de oxirredução da formação das Espécies Reativas de Oxigênio, bem como suas eliminações por seus antioxidantes específicos.	25
Figura 2 – Papéis fisiológicos e efeitos patológicos das EROS no espermatozoide, sendo a mitocôndria considerada uma organela-chave na homeostase ou desequilíbrio oxidativo celular.	27
Figura 3 – Modelo hipotético gráfico demonstrando os efeitos protetores do tratamento com MitoTEMPO e GSH durante a criopreservação espermática.	31
Figura 4 – Delineamento experimental.	34
Quadro 1 – Siglas, características do movimento espermático e seus respectivos significados.	37
Quadro 2 – setup da avaliação da cinética espermática de bovinos no CASA (Computer Assisted Sperm Analysis).	38
Figura 5 – Gráfico do efeito do GSH na dose 50 μ M de MitoTEMPO no teste de atividade mitocondrial (teste DAB).	40
Figura 6 – Gráfico do efeito do GSH nas diferentes doses de MitoTEMPO na Amplitude do movimento lateral da cabeça (ALH).	41
Figura 7 – Gráfico do efeito do GSH nas diferentes doses de MitoTEMPO na Linearidade	41
Figura 8 – Gráfico do efeito do GSH nas diferentes doses de MitoTEMPO na porcentagem de espermatozoides com membrana acrossomal lesionada e membrana plasmática íntegra (ALMI).	42
Figura 9 – Gráfico do efeito do GSH nas diferentes doses de MitoTEMPO na porcentagem de espermatozoides com membrana acrossomal íntegra e membrana plasmática íntegra (AIMI).	43
Figura 10 – Gráfico do efeito do GSH nas diferentes doses de MitoTEMPO na motilidade total.	44
Figura 11 – Gráfico do efeito do GSH nas diferentes doses de MitoTEMPO no potencial de membrana mitocondrial (PMM).	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito do GSH nas diferentes doses de MitoTEMPO na porcentagem de espermatozoides com membrana acrossomal lesionada e membrana plasmática íntegra (ALMI).	45
Tabela 2 – Efeito das diferentes doses de MitoTEMPO, na ausência de GSH, nos parâmetros de cinética espermática. Resultados expressos em porcentagem (%).	46
Tabela 3 – Efeito das diferentes doses de MitoTEMPO, na ausência de GSH, no estresse oxidativo e lesão de membrana plasmática. Resultados expressos em porcentagem (%).	47
Tabela 4 – Efeito do GSH sem MitoTEMPO.....	60
Tabela 5 – Efeito do GSH na dose 25 µM de MitoTEMPO	62
Tabela 6 – Efeito do GSH na dose 50 µM de MitoTEMPO	64
Tabela 7 – Efeito do GSH na dose 100 µM de MitoTEMPO	66
Tabela 8 – Efeito das doses de MitoTEMPO sem GSH.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL – microlitros

AIMI – acrossoma íntegro, membrana plasmática íntegra

AIML – acrossoma íntegro, membrana plasmática lesionada

ALMI – acrossoma lesionado, membrana plasmática íntegra

ALML – acrossoma lesionado, membrana plasmática lesionada

ALH – amplitude de deslocamento lateral da cabeça

ADP – difosfato de adenosina

ATP – trifosfato de adenosina

BCF – frequência de batimento flagelar cruzado

CASA – computer-assisted sperm analysis (análise computadorizada da cinética espermática)

CEUA – comissão de Ética no Uso de Animais

CRNPIN – cellRox negativo, PI negativo

CRNPIP – cellRox negativo, PI positivo

CRPPIN – cellRox positivo, PI negativo

CRPPIP – cellRox positivo, PI positivo

DAB – 3,3'-diaminobenzidina

DNA - ácido desoxirribonucleico

EROS – espécies reativas de oxigênio

FITC – isotiocianato de fluoresceína

FITC-PSA – isotiocianato de fluoresceína conjugado à aglutinina *Pisum sativum*

FMVZ – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

GLM – general linear models (método de mínimos quadrados para modelos lineares em

geral)

GSH – glutationa reduzida

GSSG – glutationa oxidada

IA – inseminação artificial

JC-1 – iodeto de 5,5',6,6' tetracloro 1,1,3,3' tetraetilbenzimidazolilcarbocianina

LIN – linearidade

M – molar

MDA – malondialdeído

mg – miligramas

min – minuto(s)

mL – mililitros

mM – milimolar

MT – MitoTEMPO

NADH – dinucleótido de adenina e nicotinamida

NADPH – fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida

nm – nanômetros

PBS – tampão fosfato-salino

PI – iodeto de propídeo

PMM – potencial de membrana mitocondrial

PUFAs – ácidos graxos poliinsaturados

SEM – standard error of the mean (erro padrão da média)

SOD – superóxido dismutase

SPTZ – espermatozoide

STR - retilinearidade

TBARS - thiobarbituric acid reactive substances (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) - indica suscetibilidade à peroxidação lipídica

TBA - ácido tiobarbitúrico

TCA - ácido tricloroacético

VAP - velocidade média de percurso

VCL - velocidade curvilínea

VSL - velocidade linear progressiva

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E O ESPERMATOZOIDE	24
2.2. DISFUNÇÕES MITOCONDRIAIS E A SUSCEPTIBILIDADE DOS ESPERMATOZOIDES ÀS EROS	26
2.3. TERAPIA ANTIOXIDANTE ESPERMÁTICA	28
2.4. TERAPIA MITOCONDRIAL	29
3. HIPÓTESE	31
4. OBJETIVOS.....	32
5. MATERIAL E MÉTODOS	33
5.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	33
5.2. CRIOPRESERVAÇÃO E DESCONGELAÇÃO ESPERMÁTICA	34
5.3. AVALIAÇÕES ESPERMÁTICAS.....	34
5.3.1. Avaliação da função mitocondrial	34
5.3.2. Avaliação da integridade de membranas plasmática e acrossomal	35
5.3.3. Avaliação do status oxidativo	36
5.3.4. Avaliação da cinética espermática	37
5.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
6. RESULTADOS.....	40
6.1. EFEITO DO GSH EM CADA DOSE DE MITOTEMPO.....	40
6.2. EFEITO DO MITOTEMPO EM CADA DOSE DE GSH.....	46
7. DISCUSSÃO.....	48
8. CONCLUSÃO	52
9. REFERÊNCIAS.....	53

10. APÊNDICES	60
Apêndice 1 – Tabelas dos efeitos do GSH em cada dose de MitoTEMPO	60
Apêndice 2 – Tabelas dos efeitos das diferentes doses de MitoTEMPO em cada dose de GSH	68

1. INTRODUÇÃO

Os sistemas de produção da pecuária no Brasil são heterogêneos em relação à forma do uso da terra, tecnologia empregada, animais, entre outros, o que representa um desafio para a sustentabilidade nos contextos econômico, social e ambiental. No entanto, o país vem apresentando melhorias nas técnicas de produção e uso das terras cultiváveis, o que elevou a produtividade do setor, passando de 39,2 kg de carcaça por hectare em 2001, para 59,5 em 2021 (ABIEC, 2022; NETO; REZENDE; GAMEIRO, 2023). Além disso, nos últimos 20 anos, a área de pastagem reduziu de 177 para 149 milhões de hectares e, em 2021, o país apresentou o segundo maior rebanho mundial, com 196,47 milhões de cabeças (LANDAU; SIMEÃO; NETO, 2020). Esse aumento da produtividade se tornou possível com a tecnificação da cadeia produtiva. No entanto, em comparação a outros países, a produtividade ainda é baixa (ABIEC, 2022). Para que o Brasil atinja seu potencial como maior produtor de proteína de origem animal é premente o desenvolvimento e utilização de biotecnologias que melhorem os índices produtivos. No aspecto da reprodução, as biotecnologias reprodutivas desempenham um papel de destaque para a melhoria da produção.

A criopreservação espermática é um processo chave para a utilização das biotecnologias reprodutivas em bovinos (HAMMERSTEDT; GRAHAM; NOLAN, 1990; HOLT, 2000; ZAPZALKA; REDMON; PRYOR, 1999). Porém, sabe-se que este procedimento causa danos ao espermatozoide. Entre os fatores envolvidos na redução da qualidade espermática durante o processo de criopreservação, pode-se citar a formação de cristais de gelo extra e intracelulares, choques térmico e osmótico e alterações de permeabilidade de membrana (GAO; CRITSER, 2000; OLDENHOF et al., 2013). Essas alterações, direta ou indiretamente, estão envolvidas no desencadeamento de processos oxidativos. As espécies reativas de oxigênio (EROS), principais mediadoras de eventos oxidativos, possuem um papel essencial na fisiologia espermática, atuando em importantes processos, tais como, capacitação, hiperativação, reação acrossomal e a interação entre espermatozoide e oócito (AGARWAL et al., 2014; LAMIRANDE et al., 1997). No entanto, um desequilíbrio entre a produção de EROS e a capacidade antioxidante celular leva ao chamado estresse oxidativo, onde as EROS produzidas em excesso irão causar danos às estruturas espermáticas. Sabe-se que a mitocôndria é a principal fonte de EROS, uma vez que a matriz mitocondrial é um ambiente rico em elétrons e oxigênio, essenciais para a formação de compostos pró-oxidativos

(AGARWAL et al., 2014; KOPPERS et al., 2008). Desta forma, acredita-se que esta organela possua um papel central no desequilíbrio oxidativo dos espermatozoides durante a criopreservação (AGARWAL et al., 2014). De fato, estudos anteriores indicam que a etiologia de diversos danos criogênicos está relacionada a disfunções mitocondriais, possivelmente pela liberação excessiva de fatores pró-oxidativos durante a criopreservação (O'CONNELL; MCCLURE; LEWIS, 2002; SARIÖZKAN et al., 2009a; THOMSON et al., 2009).

Nesse sentido, diversos pesquisadores investigam alternativas para prevenir o estresse oxidativo espermático durante o processo de criopreservação, por meio de terapias antioxidantes. No entanto, os resultados obtidos com esta abordagem trazem resultados bastante variáveis (BILODEAU et al., 2001; GUERRA et al., 2012; TAYLOR et al., 2009; VERNET; AITKEN; DREVET, 2004). Para que uma terapia antioxidante seja efetiva, é importante levar em consideração que cada ERO será neutralizada por um sistema antioxidante específico. Uma vez que a susceptibilidade dos espermatozoides às diferentes EROS pode ser variável entre diferentes situações, a identificação daquela mais deletéria pode indicar a terapia antioxidante mais promissora (AITKEN et al., 2016; GUTHRIE; WELCH, 2012). Além disso, cada estrutura espermática pode ser mais susceptível à ação de uma ERO específica, sendo necessário em alguns casos a associação entre antioxidantes. Por fim, é essencial determinar a concentração ideal de cada antioxidante, uma vez que concentrações elevadas poderiam inibir processos fisiológicos inerentes às EROS e, por outro lado, subdoses podem não ser eficientes na prevenção do estresse oxidativo (NICHI, 2003). Portanto, para que este tratamento seja eficiente, pode ser necessária uma associação de antioxidantes com concentrações específicas necessárias para cada ERO, o que pode tornar tal tratamento inviável (LOSANO et al., 2017a; LUCIO et al., 2016a; NICHI, 2009; TESARIK; GRECO; MENDOZA, 2004).

De forma alternativa ao tratamento antioxidante convencional, terapias específicas tendo como alvo a mitocôndria teriam o potencial de melhorar a qualidade espermática pós-descongelamento, por meio da prevenção na liberação excessiva de agentes pró-oxidativos mitocondriais (CUNHA et al., 2011; FANG et al., 2014; SCHOBER et al., 2007). Tal mecanismo poderia ser mais eficiente em comparação à utilização de antioxidantes convencionais, que irão eliminar as EROS que já foram formadas em resposta à um estresse celular. Uma molécula interessante a ser estudada seria o antioxidante mitocondrial MitoTEMPO que tem o potencial de proteger a mitocôndria contra o estresse oxidativo induzido pela criopreservação espermática. Esta

molécula possui ação mimética à enzima superóxido dismutase (SOD). Além disto, é capaz de prevenir a geração do radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), por meio do sequestro de metais de transição que participam da reação de Fenton. Outra ação interessante seria a prevenção da peroxidação lipídica por inibir a etapa de iniciação do processo, interagindo com o radical livre que o inicia (SOULE et al., 2007). Diferente de um antioxidante convencional, o MitoTEMPO não possui especificidade à uma determinada ERO e devido à sua facilidade de ser incorporada e se acumular na mitocôndria, a utilização desta molécula como terapia mitocondrial durante a criopreservação espermática pode ser promissora. Apesar das vantagens supracitadas em se utilizar o MitoTEMPO como terapia mitocondrial, por mimetizar a ação da enzima SOD, o aumento da dismutação do ânion superóxido pode elevar a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), causando um efeito deletério aos espermatozoides. Baseado nestas assertivas, a associação entre a molécula MitoTEMPO e antioxidantes específicos para neutralizar a formação excessiva de peróxido de hidrogênio, como os compostos do sistema da glutathiona, pode promover uma atuação sinérgica na prevenção do estresse oxidativo espermático induzido pela criopreservação.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar se o tratamento com o MitoTEMPO associado ou não à glutathiona reduzida (GSH) é capaz de prevenir a produção excessiva de EROS por meio da proteção e manutenção da função mitocondrial, melhorando aspectos quantitativos e qualitativos do sêmen criopreservado de bovinos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

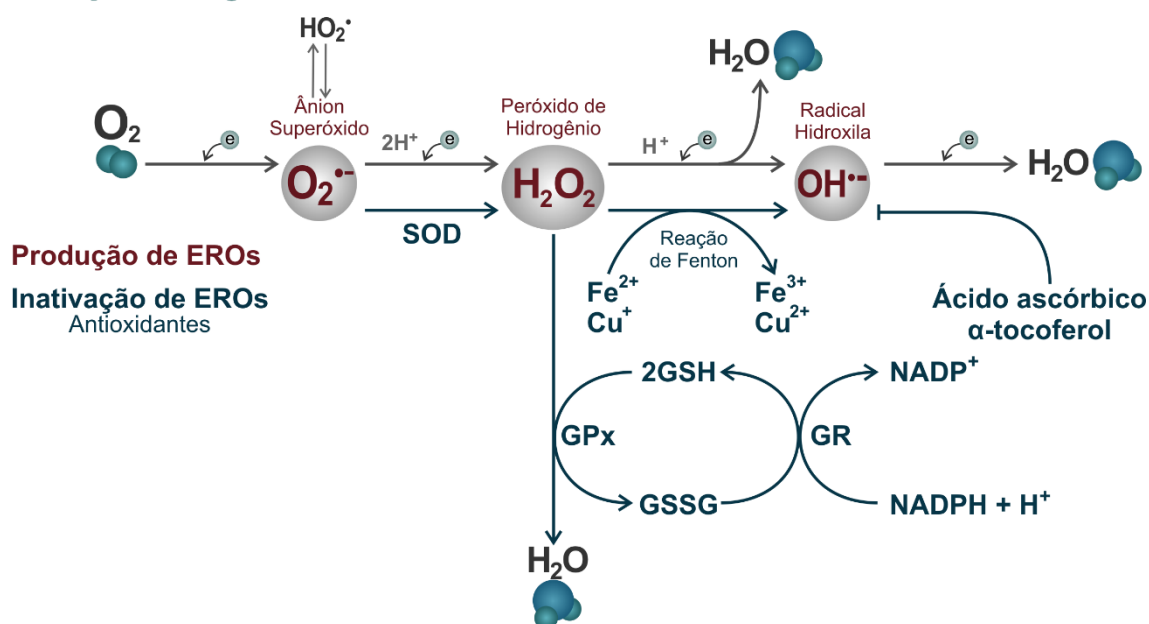
2.1. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E O ESPERMATOZOIDE

A fosforilação oxidativa é o estágio final do metabolismo produtor de energia em forma de ATP nos organismos aeróbios, envolvendo a redução de O_2 a H_2O . A energia para a síntese de ATP mitocondrial vem do gradiente eletroquímico de prótons através de membrana mitocondrial interna. Esse gradiente, é formado pelas enzimas da cadeia de transporte de elétrons enquanto elas bombeiam prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana (LAMBERT; BRAND, 2009). A energia necessária para o bombeamento de prótons é obtida à medida que os elétrons passam através dos complexos mitocondriais (Complexos I a IV). No entanto, parte desses elétrons pode escapar dos complexos enzimáticos e reduzir o oxigênio molecular, dando origem à primeira ERO, o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). A partir da formação do $O_2^{\bullet-}$ inicia-se uma reação em cascata de oxirredução dando origem as outras EROS, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\bullet}) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; LAMBERT; BRAND, 2009; NORDBERG; ARNÉR, 2001). As EROS possuem um papel fisiológico na função espermática, atuando em importantes processos, tais como a hiperativação espermática (DE LAMIRANDE; GAGNON, 1993), capacitação espermática (AITKEN et al., 2004), reação acrossomal (DE LAMIRANDE et al., 1998), e interação entre o espermatozoide e a zona pelúcida (AITKEN et al., 1995), atuando geralmente como gatilhos destas reações.

Os espermatozoides, bem como o plasma seminal, contêm uma série de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, que possuem especificidade na eliminação das EROS formadas em excesso, principalmente durante a respiração mitocondrial (Figura 1). A enzima superóxido dismutase (SOD) é o antioxidante que atua no início da cascata de oxirredução de formação das EROS, participando na dismutação do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), dando origem ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (ALVAREZ et al., 1987). O peróxido de hidrogênio pode ser inativado por dois sistemas antioxidantes diferentes: ação da enzima catalase, ou pela ação do sistema antioxidante da glutatona (NORDBERG; ARNÉR, 2001). Caso estes sistemas não sejam eficientes, o H_2O_2 pode ainda reagir com o Fe^{2+} ou com o Cu^+ (Reação de Fenton), dando origem ao radical hidroxila (OH^{\bullet}), que por sua vez pode ser inativada por antioxidantes não enzimáticos, tais como o ácido ascórbico e o α – tocoferol (Figura 1).

Figura 1 – Reação em cascata de oxirredução da formação das Espécies Reativas de Oxigênio, bem como suas eliminações por seus antioxidantes específicos.

Redução do oxigênio



Fonte: Leite (2023)

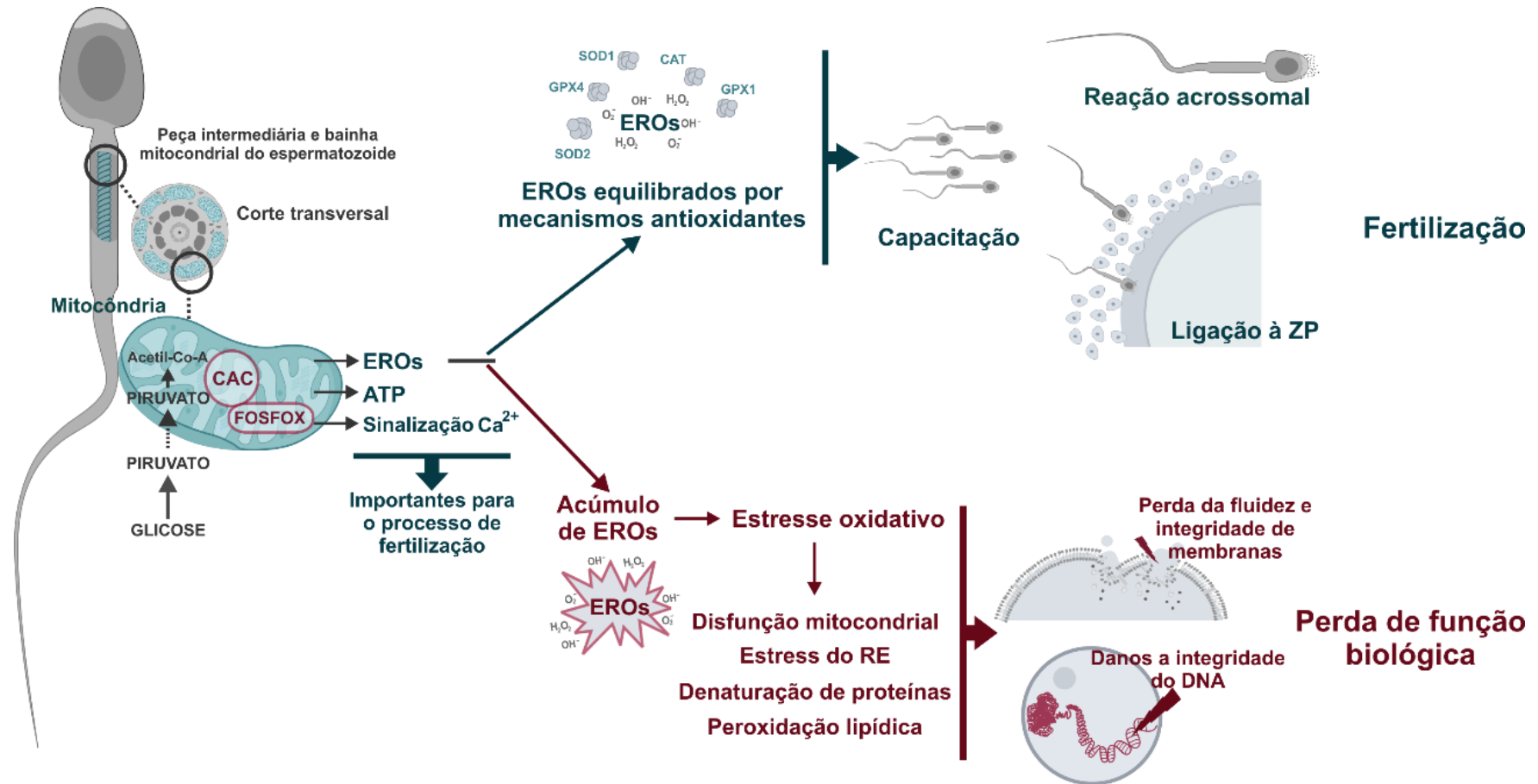
Nesta reação, a enzima superóxido dismutase (SOD) participa na dismutação do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), dando origem ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O peróxido de hidrogênio pode ser inativado por dois sistemas antioxidantes diferentes: ação da enzima catalase, ou pela ação do sistema antioxidante da glutatona. O H_2O_2 pode ainda reagir com o Fe^{2+} ou com o Cu^+ (Reação de Fenton), dando origem ao radical hidroxila (OH^{\bullet}), que por sua vez pode ser inativada por antioxidantes não enzimáticos, tais como o ácido ascórbico e o α -tocoferol.

2.2. DISFUNÇÕES MITOCONDRIAIS E A SUSCEPTIBILIDADE DOS ESPERMATOZOIDES ÀS EROS

Apesar da função fisiológica das EROS, quando há um desequilíbrio entre sua formação e a capacidade antioxidante espermática, a célula se encontra em um estado de estresse oxidativo, que pode ser letal (Figura 2) (O'CONNELL; MCCLURE; LEWIS, 2002; SARIÖZKAN et al., 2009a; THOMSON et al., 2009). Nestas condições, o espermatozoide, por ter um conteúdo citoplasmático menor em relação a uma célula somática, e consequente limitação na quantidade de antioxidantes e mecanismos de reparação de danos celulares, é particularmente susceptível aos efeitos deletérios das EROS (KUMAR et al., 2019; NICHI et al., 2007b; SARIÖZKAN et al., 2009b). Além disso, a membrana plasmática do espermatozoide é rica em ácidos graxos poli-insaturados, que são essenciais à fisiologia espermática, porém mais susceptíveis a serem oxidados pelas EROS (LAMIRANDE et al., 1997; NICHI et al., 2007a). Ademais, os produtos da peroxidação lipídica, como o malondialdeído (MDA), podem ser tão tóxicos aos espermatozoides quanto as próprias EROS. Assim, o desbalanço oxidativo pode causar danos às diferentes estruturas do espermatozoide, como a membrana plasmática e acrossomal, a mitocôndria e o DNA espermático. Essa situação é ainda mais grave, já que o espermatozoide não possui um mecanismo de reparo de danos oxidativos, além de ser uma célula transcricionalmente silenciada (AGARWAL et al., 2014; NICHI et al., 2007a; VERNET; AITKEN; DREVET, 2004).

Sabe-se que a mitocôndria é a principal fonte de EROS em células aeróbias, uma vez que a matriz mitocondrial é um ambiente rico em elétrons e oxigênio, essenciais para a formação de compostos pró-oxidantes (AGARWAL et al., 2014; KOPPERS et al., 2008). De fato, estudos anteriores indicam que a etiologia de diversos danos criogênicos está relacionada à disfunções mitocondriais, possivelmente pela liberação excessiva de fatores pró-oxidativos durante a criopreservação (O'CONNELL; MCCLURE; LEWIS, 2002; SARIÖZKAN et al., 2009a; THOMSON et al., 2009). Sendo assim, diversos estudos investigam maneiras de prevenir o estresse oxidativo dos espermatozoides submetidos às biotecnologias do sêmen.

Figura 2 – Papéis fisiológicos e efeitos patológicos das EROS no espermatozoide, sendo a mitocôndria considerada uma organela-chave na homeostase ou desequilíbrio oxidativo celular.



Fonte: Leite (2023)

2.3. TERAPIA ANTIOXIDANTE ESPERMÁTICA

Diversos pesquisadores investigam alternativas para prevenir o estresse oxidativo espermático durante o processo de criopreservação por meio de terapias antioxidantes (BILODEAU et al., 2001; TAYLOR et al., 2009). No entanto, estudos utilizando a terapia antioxidante em amostras espermáticas apresentam resultados controversos; alguns observando melhora, outros apresentando resultados inconclusivos e alguns obtendo resultados negativos (LOSANO et al., 2017a; LUCIO et al., 2016a; TESARIK; GRECO; MENDOZA, 2004). É importante destacar que, para que uma terapia antioxidante seja eficiente, deve-se considerar alguns aspectos. Um ponto inicial e fundamental seria a presença de espécies reativas capazes de sobrepujar as defesas antioxidantes do sistema, ou seja, o sistema celular deve estar em estresse oxidativo. No caso da criopreservação espermática, diversos estudos indicam este quadro de fato ocorre (AITKEN; CURRY, 2011; MARTINDALE; HOLBROOK, 2002). Outro aspecto que deve ser considerado é que cada ERO será neutralizada por um sistema antioxidante específico. Estudos indicam que, diferentes espécies reativas podem ser mediadoras de danos dependendo da espécie ou condição (AITKEN; ROMAN, 2008; O'FLAHERTY, 2014). Sendo assim, um tratamento antioxidante que não possua especificidade à espécie reativa de oxigênio em questão, pode não ser eficiente ou até mesmo exercer um efeito tóxico. Ademais, cada estrutura espermática pode ser mais susceptível à ação de uma ERO específica, nos sugerindo que, em alguns casos faz-se necessário a associação entre antioxidantes, para que estes atuem de forma sinérgica a fim de prevenir danos oxidativos destas estruturas (BANDAY et al., 2017; CÂMARA et al., 2011). Por fim, é essencial determinar a concentração ideal de cada antioxidante antes utilizá-lo em uma terapia, uma vez que, quantidades reduzidas podem não ser suficientes para manter a homeostase oxidativa celular e, por outro lado, níveis elevados de antioxidantes podem inibir os processos fisiológicos das EROS, promovendo um efeito deletério aos espermatozoides e aos processos de fecundação (LOSANO et al., 2017b; LUCIO et al., 2016b). Tendo em vista as dificuldades do tratamento antioxidante convencional, a prevenção da formação de EROS pela mitocôndria seria uma alternativa interessante (SCHOBER et al., 2007). Desta forma, terapias específicas tendo como alvo essa organela, com o intuito de prevenir a produção excessiva de EROS durante a criopreservação, teriam o potencial de melhorar a qualidade espermática pós-descongelamento.

2.4. TERAPIA MITOCONDRIAL

Uma possível alternativa à terapia antioxidante convencional, seria o uso do MitoTEMPO ((2-(2,2,6,6-Tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-ylamino)-2-oxoethyl) triphenylphosphonium chloride) como protetor mitocondrial contra o estresse oxidativo induzido pela criopreservação espermática. Esta molécula é composta pela combinação entre um nitróxido de piperidina (TEMPO) e o cátion lipofílico trifenilfosfônio (TPP) (TRNKA et al., 2009). O TEMPO, assim como outros nitróxidos, possui ação mimética à enzima superóxido dismutase (SOD), participando na reação de dismutação do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) como catalisador, não sendo consumido no processo; além disso é capaz de prevenir a geração do radical hidroxila ($\cdot OH$), formado por meio da reação de Fenton, por aceitar um elétron do complexo metálico reduzido, e conseqüentemente, previne a peroxidação lipídica por inibir a etapa de iniciação do processo, interagindo com o radical livre que o inicia (SOULE et al., 2007). Em um estudo anterior realizado pelo nosso grupo, verificou-se que os espermatozoides bovinos são mais susceptíveis à peroxidação lipídica quando desafiados com radical hidroxila em comparação aos outros compostos pró-oxidativos (dados não publicados).

O TPP é um cátion lipofílico permeável à membrana mitocondrial interna, que possui um efeito acumulativo nesta organela, uma vez que a matriz mitocondrial possui características negativas, atraindo esta molécula constantemente para a mitocôndria (MURPHY; SMITH, 2007; ROSS et al., 2005). Além disso, ao atuar na mitocôndria neutralizando ou prevenindo a formação das espécies reativas de oxigênio, o MitoTEMPO é espontaneamente regenerado pela ubiquinona, composto presente na cadeia transportadora de elétrons, favorecendo a manutenção da biodisponibilidade desta molécula em sua forma ativa na matriz mitocondrial (MURPHY; SMITH, 2007; ROSS et al., 2005). Portanto, por esta molécula não possuir especificidade à uma determinada ERO, como um antioxidante convencional, e devido à sua facilidade de ser incorporada e se acumular na mitocôndria, a utilização desta molécula como terapia mitocondrial durante a criopreservação espermática pode ser promissora.

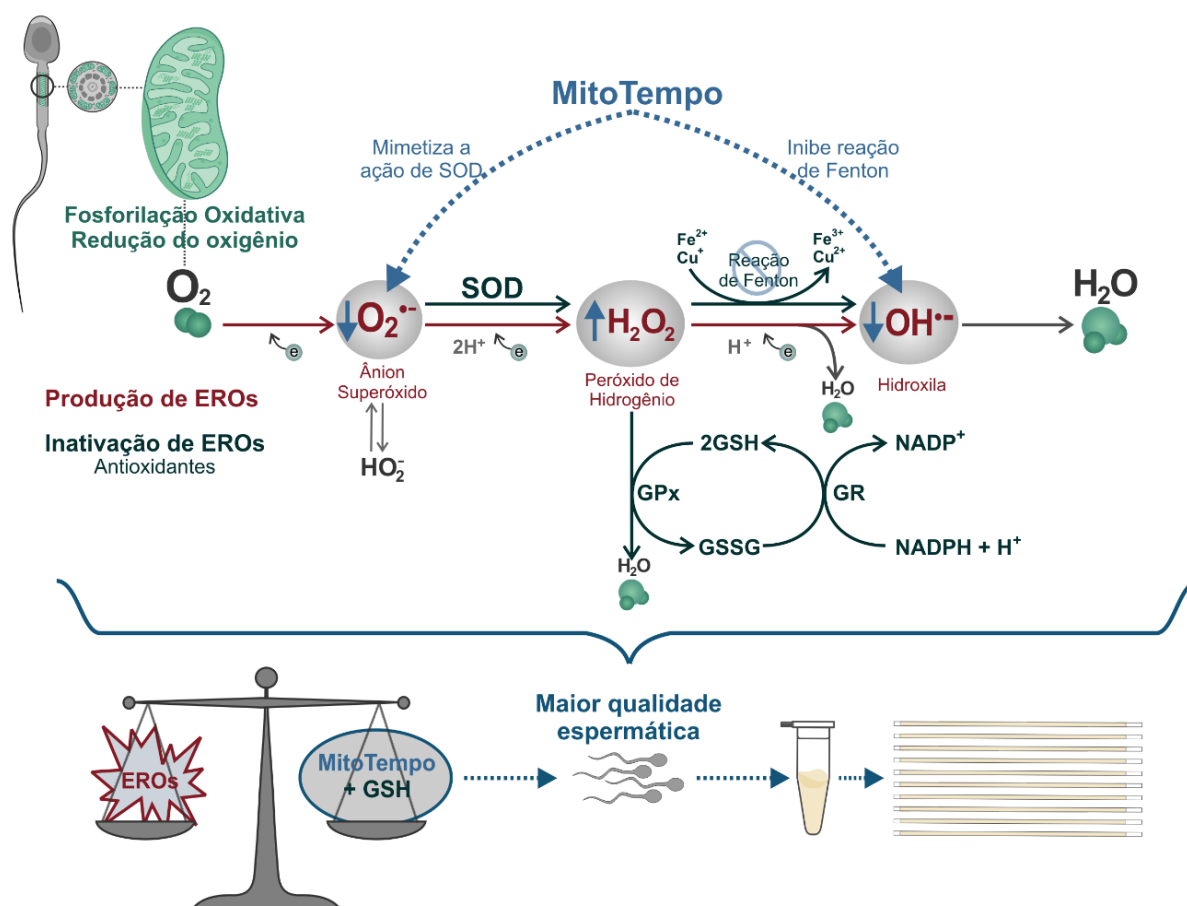
Apesar das vantagens supracitadas em se utilizar o MitoTEMPO como terapia mitocondrial, por mimetizar a ação da enzima SOD, o aumento da dismutação do ânion superóxido pode elevar a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), causando um efeito deletério aos espermatozoides. Sendo assim, para que o MitoTEMPO possa expressar seu máximo potencial antioxidante sem causar efeitos deletérios, a neutralização da formação excessiva de peróxido de hidrogênio deve ser levada em consideração. Baseado nestas

assertivas, a associação entre a molécula MitoTEMPO e antioxidantes específicos para neutralizar a formação excessiva de peróxido de hidrogênio, como a glutathiona reduzida (GSH), podem atuar sinergicamente na prevenção do estresse oxidativo espermático induzido pela criopreservação. Portanto, objetivamos no presente estudo verificar um possível efeito sinérgico desses compostos na prevenção do estresse oxidativo dos espermatozoides bovinos submetidos à criopreservação.

3. HIPÓTESE

A suplementação do meio de criopreservação espermática com os antioxidantes MitoTEMPO e glutathiona reduzida (GSH), isoladamente ou em conjunto, melhoram a qualidade seminal pós descongelamento.

Figura 3 – Modelo hipotético gráfico demonstrando os efeitos protetores do tratamento com MitoTEMPO e GSH durante a criopreservação espermática.



Fonte: Leite (2023)

O MitoTEMPO mimetiza a ação da enzima superóxido dismutase (SOD), participando na reação de dismutação do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e previne a geração do radical hidroxila ($\bullet OH$), formado por meio da reação de Fenton, por aceitar um elétron do complexo metálico reduzido. Porém, por ter ação mimética a enzima SOD causa um aumento na formação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Portanto, a associação entre a molécula MitoTEMPO e antioxidantes específicos para a eliminação do peróxido de hidrogênio, como a glutathiona reduzida (GSH), atuam sinergicamente prevenindo a liberação excessiva de EROs, mantendo o equilíbrio oxidativo e consequentemente melhorando a qualidade espermática.

4. OBJETIVOS

Verificar o efeito de diferentes concentrações da molécula antioxidante MitoTEMPO com e sem a associação do antioxidante glutathiona reduzida (GSH) nas características morfofuncionais e status oxidativo dos espermatozoides bovinos criopreservados.

Verificar se as moléculas MitoTEMPO e GSH atuam de forma sinérgica melhorando a qualidade espermática pós-descongelamento por meio da prevenção da liberação excessiva de EROS durante o processo de criopreservação.

5. MATERIAL E MÉTODOS

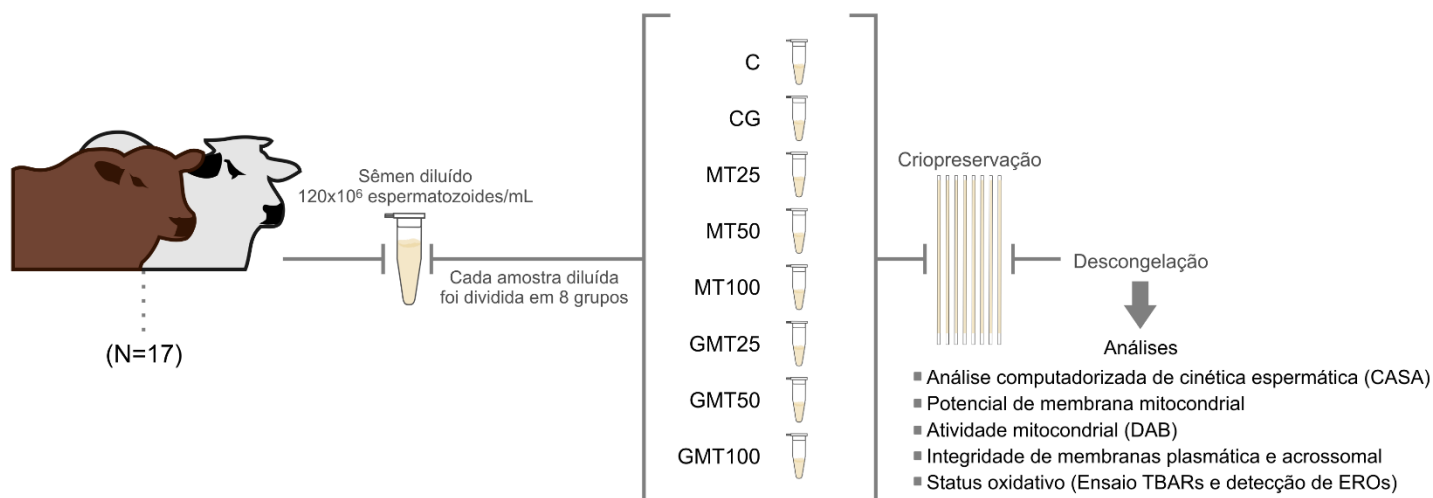
5.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Ejaculados de 17 bovinos, doados pela central Seleon Biotecnologia, foram coletados com uso de vagina artificial. Recebidos os ejaculados, foram divididos em 8 alíquotas, que foram diluídas em meio de criopreservação a uma concentração final de 120×10^6 espermatozoides/ml, são elas:

- Alíquota não tratada, considerada grupo controle, nomeada **C**;
- Alíquota tratada apenas com GSH, controle GSH, nomeada **CG**;
- Alíquota tratada com MitoTEMPO na concentração 25 μM (**MT25**);
- Alíquota tratada com MitoTEMPO na concentração 50 μM (**MT50**);
- Alíquota tratada com MitoTEMPO na concentração 100 μM (**MT100**);
- Alíquota tratada com MitoTEMPO na concentração 25 μM na presença de GSH (**GMT25**);
- Alíquota tratada com MitoTEMPO na concentração 50 μM na presença de GSH (**GMT50**);
- Alíquota tratada com MitoTEMPO na concentração 100 μM na presença de GSH (**GMT100**).

Após a diluição, as amostras foram estabilizadas a 4 °C, envasadas em palhetas de 0,25 ml e submetidas ao processo de criopreservação, descongelamento e avaliações espermáticas (Figura 4). As concentrações de MitoTEMPO que foram utilizadas neste estudo, foram baseadas em um estudo conduzido por Zhang et al (2019a), no qual espermatozoides humanos foram submetidos ao tratamento com essa molécula, no entanto, no presente estudo foram utilizadas doses espaçadas para selecionar uma faixa ideal de MitoTEMPO para a espécie bovina. A concentração de GSH utilizada foi baseada no estudo conduzido por Daghigh-Kia et al (2014).

Figura 4 – Delineamento experimental.



5.2. CRIOPRESERVAÇÃO E DESCONGELAÇÃO ESPERMÁTICA

Imediatamente após as diluições e tratamentos, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,25mL e submetidas à criopreservação espermática. Uma semana após o processo de criopreservação, as amostras foram descongeladas a 37°C durante 30 segundos e submetidas às análises espermáticas.

5.3. AVALIAÇÕES ESPERMÁTICAS

5.3.1. Avaliação da função mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial foi avaliado por meio da sonda fluorescente JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'201-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine chloride; Invitrogen, Eugene, OR, USA), utilizando citômetro de fluxo (Guava EasyCyte™ Mini System, Guava® Technologies, 190 Hayward, CA, E.U.A.). Para realizar esta técnica, 187.500 espermatozoides foram adicionados a 0,5µL de JC-1 (76.5mM) e incubados a 37°C durante 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram classificadas em porcentagem de células com alto (JC-1 alto), intermediário (JC-1 intermediário) e baixo potencial de membrana mitocondrial (JC-1 baixo).

Para analisar a atividade mitocondrial, a eficiência do transporte de elétrons entre os complexos enzimáticos na membrana mitocondrial interna foi verificada pela técnica

citoquímica utilizando a 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Esta molécula é oxidada por um dos complexos enzimáticos, chamados citocromo C, e forma um complexo de coloração marrom que se deposita em mitocôndrias ativas (HRUDKA, 1987). Para a realização desta técnica, uma alíquota de 20µL da amostra foi incubada junto a 20µL de 3,3'-Diaminobenzidina (1mg/mL de PBS) em um tubo de microcentrífuga âmbar durante 1 hora em banho-maria a 37°C. Após a incubação, foi realizado um esfregaço em lâminas de microscopia em local protegido da luz, que foram posteriormente fixadas em formaldeído 10% durante 10 minutos. A leitura das lâminas foi realizada em microscopia com contraste de fase em magnificação de 1000 x sob óleo de imersão. Foram contadas 200 células e classificadas em 4 classes de acordo com a porcentagem de mitocôndrias coradas em marrom, portanto ativas, sendo classificadas em: alta atividade mitocondrial (Classe I), intermediária (Classe II), baixa (Classe III) e ausência de atividade mitocondrial (Classe IV).

5.3.2. Avaliação da integridade de membranas plasmática e acrossomal

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

Também foi utilizada a coloração Eosina Nigrosina (EN) para avaliar a integridade da membrana plasmática. Uma alíquota de 5µL de sêmen foi misturada a uma de 5 µL de corante em uma mesa aquecida a 37 °C. Após 30 segundos de incubação, foi realizado o esfregaço e em seguida a análise em aumento de 1000 vezes sob óleo de imersão em microscópio ótico (Nikon, Eclipse E200, Japan). Os resultados foram expressos em porcentagem (%). Foram contadas 100 células por lâmina, classificadas

como: membrana íntegra: o corante não penetrou e observa-se a cabeça do espermatozoide branca em contraste ao fundo escuro da nigrosina; e membrana lesionada: o corante consegue penetrar na célula e observa-se coloração rosa na cabeça do espermatozoide.

5.3.3. Avaliação do status oxidativo

As detecções das espécies reativas de oxigênio foram realizadas por meio da sonda fluorescente CellRox[®] green (Molecular Probes, Eugene, OR, E.U.A.). Esta sonda fluorescente penetra na célula e, quando oxidada por EROS intracelulares, se liga ao DNA emitindo uma fluorescência verde mais intensa. Para realizar este procedimento, 187.500 células foram incubadas com a sonda CellRox[®] green, em uma concentração de 5 µM, a 37 °C durante 30 minutos e, 10 minutos anteriormente aos 30 minutos a sonda IP foi adicionada a uma concentração final de 6 µM. As amostras foram analisadas por meio da técnica de citometria de fluxo, excitadas a 488nm e detectadas a 630-650nm para a sonda IP e 515-530 para a sonda CellRox[®] green., obtendo-se assim o resultado combinado entre integridade das membranas plasmática e detecção de espécies reativas de oxigênio. Desta maneira quatro populações espermáticas foram formadas: células com detecção de altos níveis de espécies reativas de oxigênio e com membrana plasmática lesionada (CRPPIP), células com detecção de altos níveis de espécies reativas de oxigênio e com membrana plasmática íntegra (CRPPIN), células com detecção de baixos níveis de espécies reativas de oxigênio e com membrana plasmática lesionada (CRNPIP) e células com detecção de baixos níveis de espécies reativas de oxigênio e com membrana plasmática íntegra (CRNPIN).

A avaliação das amostras à susceptibilidade a peroxidação lipídica foi realizada por meio do Ensaio TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances), desenvolvido por Ohkawa et al. (1979), por meio da indução da peroxidação lipídica. A lipoperoxidação das amostras foi induzida pela incubação de 50 µL de ácido ascórbico (20 mM) e 50 µL de sulfato de ferro (4 mM) junto a 200 µL de sêmen em banho-maria durante 90 minutos. Após a indução, junto aos 300 µL de amostra (sêmen com adição de sulfato de ferro e ácido ascórbico), foram adicionados 600 µL de ácido tricloroacético a 10% (TCA 10%). Em seguida, a amostra foi então centrifugada na capacidade máxima de rotação da centrífuga (20800G) durante 15 minutos a 5 °C para que ocorra a precipitação das proteínas e células. Alíquotas de 800 µL de sobrenadante foram

recuperadas e transferidas para criotubos, nos quais foram adicionados 800 μL de ácido tiobarbitúrico 1% (TBA 1%). Os tubos foram submetidos à 95 °C em banho-maria durante 15 minutos para que as moléculas de malondialdeído e TBA reajam, e posteriormente imersos em gelo para interrupção da reação. Após a indução da peroxidação lipídica da membrana espermática, ocorre a formação do malondialdeído (MDA; principal produto da peroxidação lipídica), que ao reagir com o TBA produz uma solução de coloração rósea. Essa coloração por sua vez, foi quantificada em espectrofotômetro (Ultrospec 3300 pro[®], Amersham Biosciences) com comprimento de onda de 532 nanômetros. Sendo assim, a avaliação da susceptibilidade à peroxidação lipídica foi expressa em nanogramas de TBARS/ 10⁶ espermatozoides (NICHII et al., 2006).

5.3.4. Avaliação da cinética espermática

As motilidades total e progressiva foram analisadas por meio do sistema CASA (Computer Assisted Sperm Analysis; Hamilton-Thorne[®], Ivos 12.3, USA). Além das motilidades, foram avaliados diversos parâmetros do movimento espermático, descritos no Quadro 1.

Ademais, os espermatozoides foram divididos em 4 grupos baseando-se nas respectivas velocidades: Rápidos (RAPID; VAP > 50 $\mu\text{m/s}$; %), Médios (MEDIUM, 30 $\mu\text{m/s}$ < VAP < 50 $\mu\text{m/s}$; %), lentos (SLOW; VAP < 30 $\mu\text{m/s}$ ou VSL < 15 $\mu\text{m/s}$; %) e estáticos (STATIC; %).

Quadro 1 – Siglas, características do movimento espermático e seus respectivos significados.

Sigla	Terminologia	Significado
VAP	Velocidade média de percurso ($\mu\text{m/s}$)	Velocidade média do espermatozoide considerando-se um caminho suavizado.
VSL	Velocidade retilínea ($\mu\text{m/s}$)	É a velocidade média em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e o último ponto da trajetória do espermatozoide.

VCL	Velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s}$)	É a velocidade da trajetória real do espermatozoide.
ALH	Amplitude do movimento lateral da cabeça (μm)	É a amplitude do deslocamento médio da cabeça do espermatozoide em sua trajetória real.
BCF	Frequência de batimento cruzado (Hz)	É o número de vezes que a cabeça do espermatozoide cruza a direção do movimento.
STR	Retilinearidade (VSL/VAP, %)	Qualidade do movimento retilíneo suavizado percorrido
LIN	Linearidade (VSL/VCL, %)	Qualidade do movimento retilíneo real percorrido.

Para a análise, utilizou-se o setup para espécie bovina previamente definido pelo fabricante do aparelho, como descrito no Quadro 2.

Quadro 2 – setup da avaliação da cinética espermática de bovinos no CASA (Computer Assisted Sperm Analysis).

	Image Capture
Frames per second (Hz)	60
Number of frames	30
	Cell Detection
Minimum contrast	80
Minimum cell size (pix)	5
	Progressive Cells
Path velocity (VAP - $\mu\text{m/s}$)	50
Straightness (STR - %)	70
	Defaults (if <5 motile cells)
Cell size (pix)	5
Cell intensity	70
	Slow Cells
VAP cutoff ($\mu\text{m/s}$)	30
VSL cutoff ($\mu\text{m/s}$)	15
	Static Intensity Gates
Minimum	0.3

Maximum	1.7
	Static Size Gates
Minimum	0.1
Maximum	3.4
	Static Elongation Gates
Minimum	8
Maximum	97

Fonte: Hamilton Thorne Technical Guide for IVOS, TOX/IVOS, CEROS version 12.3 (2008).

5.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados por meio do programa do SAS System for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, E.U.A.). Os dados de cada variável resposta foram testados quanto à normalidade dos resíduos (distribuição de Gauss) e homogeneidade das variâncias por meio do aplicativo Guided Data Analysis. Após este procedimento, quando necessário, as variáveis foram submetidas às suas devidas transformações. O efeito do MitoTEMPO em cada concentração de GSH foi realizada através da análise de variância seguido do teste de médias (LSD), e o efeito do GSH em cada concentração de MitoTEMPO foi realizada através do teste t de student.

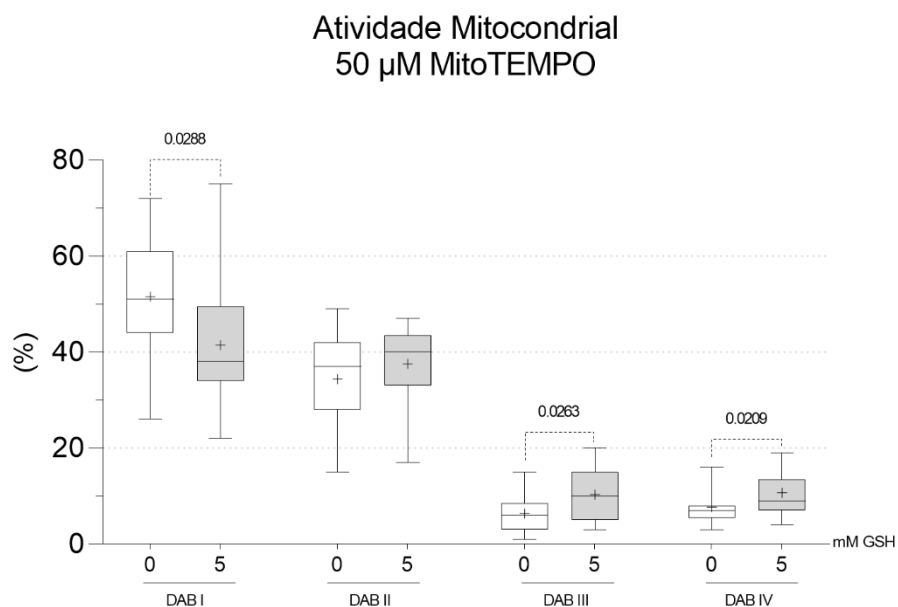
O nível de significância utilizado para rejeitar H₀ (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05; considerar-se-á que ocorreram diferenças estatísticas entre as variáveis classificatórias (tratamentos) para uma determinada variável resposta.

6. RESULTADOS

6.1. EFEITO DO GSH EM CADA DOSE DE MITOTEMPO

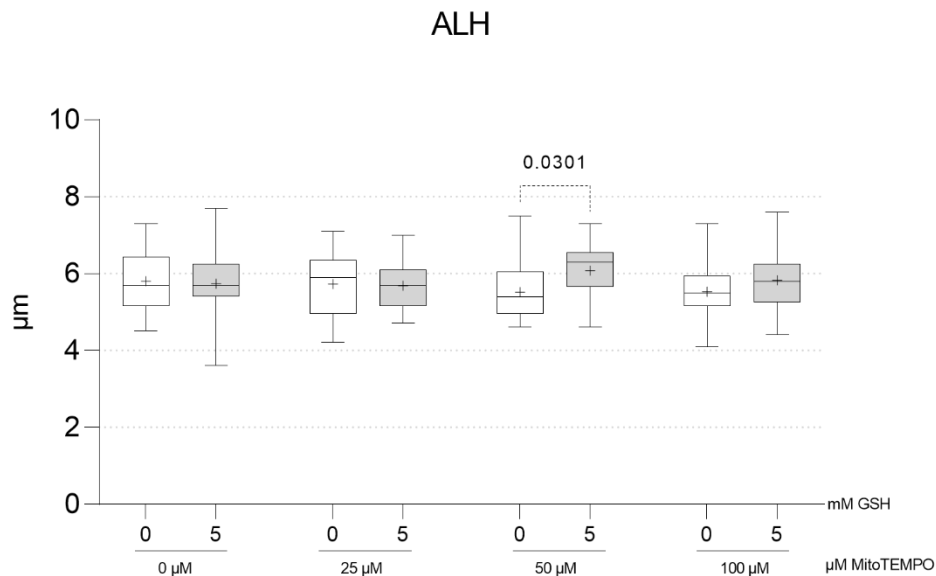
Na avaliação da atividade mitocondrial através do teste DAB, nas amostras tratadas com GSH e 50 μ M de MitoTEMPO houve redução da porcentagem de espermatozoides com alta (DAB I) e aumento de espermatozoides com baixa (DAB III) ou ausência (DAB IV) de atividade mitocondrial, quando comparado com as amostras sem GSH na mesma concentração de MitoTEMPO (figura 5). Nesta mesma comparação, houve aumento do ALH e redução da linearidade (figuras 6 e 7) nas amostras tratadas com GSH.

Figura 5 – Gráfico do efeito do GSH na dose 50 μ M de MitoTEMPO no teste de atividade mitocondrial (teste DAB).



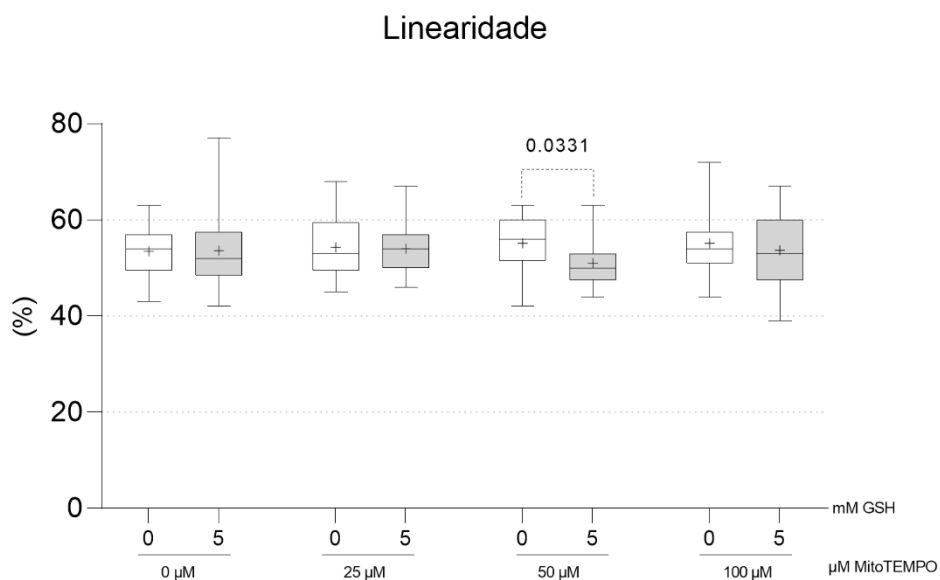
Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartil, limites máximo e mínimo e média (+); diferenças entre os grupos são marcadas por linhas com o valor de *P* sobre as mesmas.

Figura 6 – Gráfico do efeito do GSH nas diferentes doses de MitoTEMPO na Amplitude do movimento lateral da cabeça (ALH).



Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartil, limites máximo e mínimo e média (+); diferenças entre as doses de GSH são marcadas por linhas com o valor de *P* sobre as mesmas.

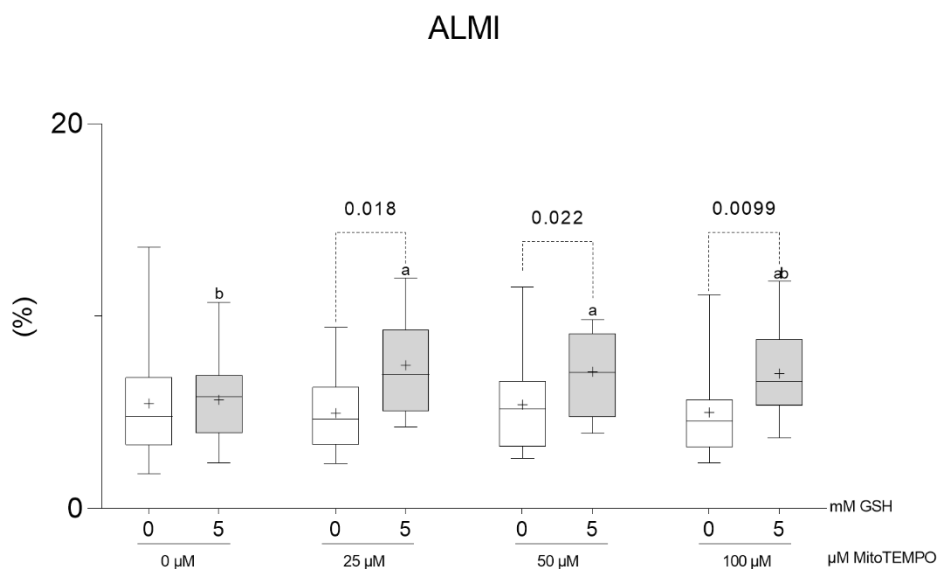
Figura 7 – Gráfico do efeito do GSH nas diferentes doses de MitoTEMPO na Linearidade



Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartil, limites máximo e mínimo e média (+); diferenças entre os grupos são marcadas por linhas com o valor de *P* sobre as mesmas.

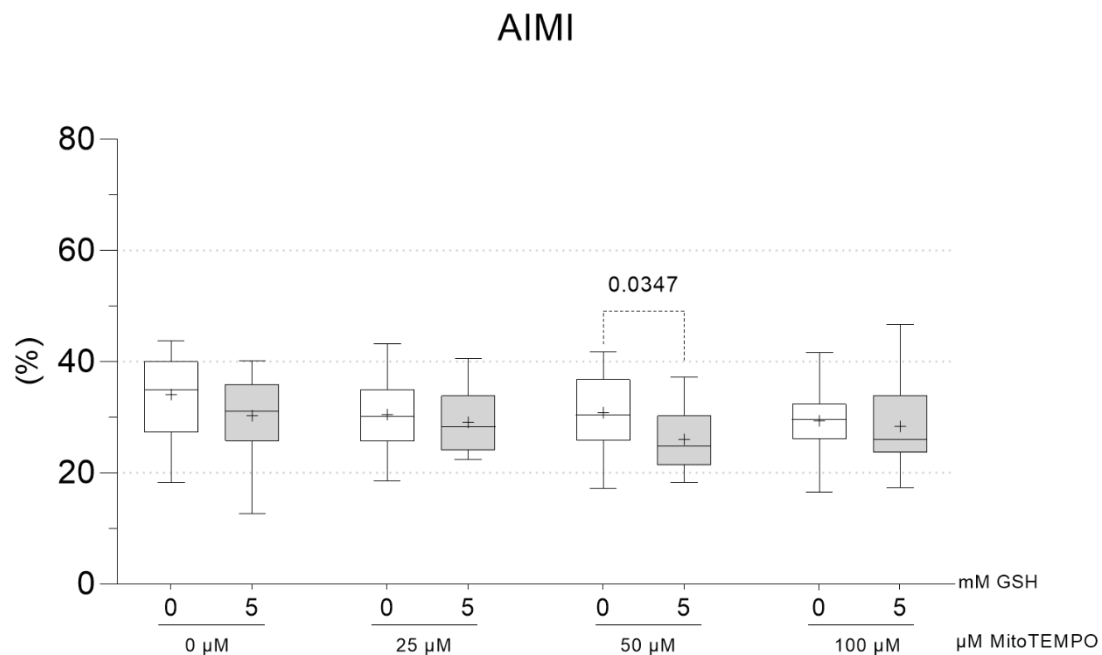
Ainda na associação com GSH, houve aumento na porcentagem de espermatozoides com membrana acrossomal lesionada e membrana plasmática íntegra (ALMI) (figura 8) e redução nos com membrana acrossomal e plasmática íntegras (AIMI) (figuras 9).

Figura 8 – Gráfico do efeito do GSH nas diferentes doses de MitoTEMPO na porcentagem de espermatozoides com membrana acrossomal lesionada e membrana plasmática íntegra (ALMI).



Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartil, limites máximo e mínimo e média (+); diferenças entre os grupos são marcadas por linhas com o valor de *P* sobre as mesmas. ^{a,b}: letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0.05$).

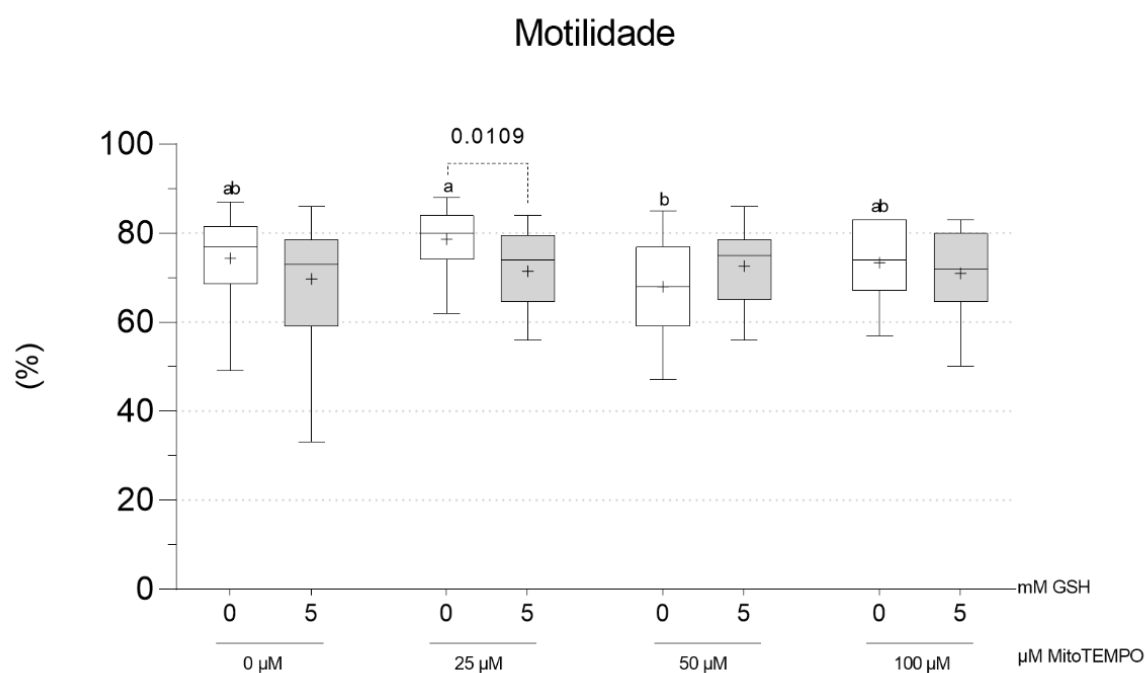
Figura 9 – Gráfico do efeito do GSH nas diferentes doses de MitoTEMPO na porcentagem de espermatozoides com membrana acrossomal íntegra e membrana plasmática íntegra (AIMI).



Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartil, limites máximo e mínimo e média (+); diferenças entre os grupos são marcadas por linhas com o valor de *P* sobre as mesmas. ^{a,b}: letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0.05$).

Nas amostras tratadas com GSH e 25 μM de MitoTEMPO houve redução da motilidade total e aumento da porcentagem de células com lesão acrossomal e membrana plasmática íntegra (ALMI), comparado ao grupo sem GSH, na mesma concentração de MitoTEMPO (figuras 8 e 10).

Figura 10 – Gráfico do efeito do GSH nas diferentes doses de MitoTEMPO na motilidade total.



Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartil, limites máximo e mínimo e média (+); diferenças entre os grupos são marcadas por linhas com o valor de *P* sobre as mesmas. ^{a,b}: letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0.05$).

Assim como nas doses de 25 e 50, a dose de 100 μM MitoTEMPO apresentou aumento significativo ($p < 0,05$) na porcentagem de células com acrossoma lesionado e membrana plasmática íntegra (ALMI) quando associado ao GSH (tabela 1).

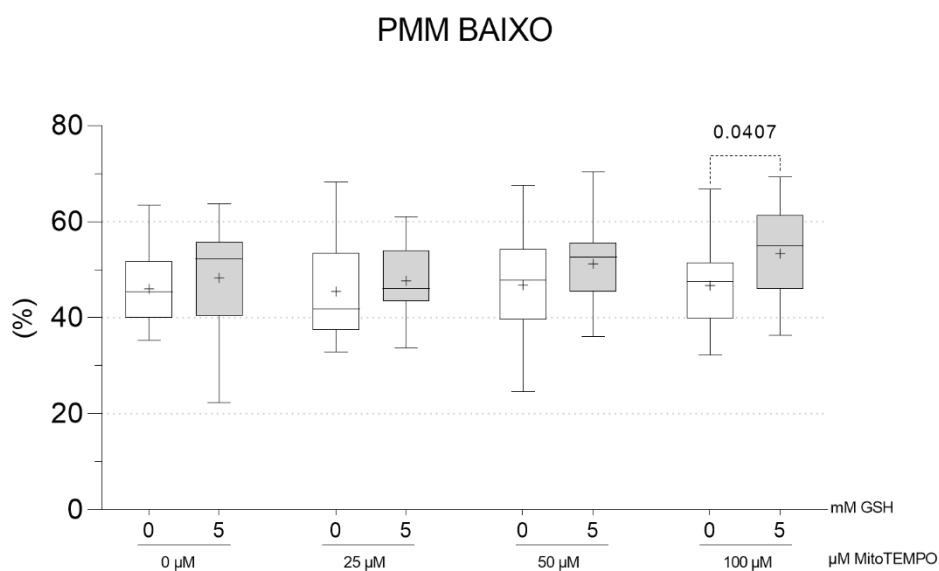
Tabela 1 – Efeito do GSH nas diferentes doses de MitoTEMPO na porcentagem de espermatozoides com membrana acrossomal lesionada e membrana plasmática íntegra (ALMI).

ALMI			
GSH			
MitoTEMPO	0 mM	5 mM	P
0 μM	5.47 \pm 0.76	5.66 \pm 0.54	0.5621
25 μM	4.98 \pm 0.47	7.45 \pm 0.59	0.0018
50 μM	5.41 \pm 0.60	7.12 \pm 0.52	0.022
100 μM	5.00 \pm 0.61	7.03 \pm 0.57	0.0099

Resultados descritos como média \pm SEM (erro padrão da média) e valor de p. Valores de $p < 0.05$ representam que houve diferença estatística significativa (em vermelho).

Amostras tratadas com GSH e 100 μM de MitoTEMPO apresentaram maior porcentagem de células com baixo potencial de membrana mitocondrial (PMM baixa) em relação ao grupo sem GSH (figura 11).

Figura 11 – Gráfico do efeito do GSH nas diferentes doses de MitoTEMPO no potencial de membrana mitocondrial (PMM).



Resultados apresentados em *boxplot* com mediana, espaço interquartil, limites máximo e mínimo e média (+); diferenças entre os grupos são marcadas por linhas com o valor de P sobre as mesmas.

As tabelas com todos os resultados dos efeitos das doses de GSH em cada dose de MitoTEMPO estão disponibilizadas no apêndice 1, tabelas 4 a 7. Resultados descritos como média \pm SEM (erro padrão da média).

6.2. EFEITO DO MITOTEMPO EM CADA DOSE DE GSH

Nos parâmetros de cinética não houve diferença entre as doses de MitoTEMPO na presença de GSH. Na ausência do GSH houve diferença ($p < 0,05$) entre os grupos tratados com 25 e 50 μ M de MitoTEMPO na motilidade total, espermatozoides lentos e estáticos, porém nenhuma dose diferiu do grupo controle (tabela 2).

Tabela 2 – Efeito das diferentes doses de MitoTEMPO, na ausência de GSH, nos parâmetros de cinética espermática. Resultados expressos em porcentagem (%).

Variável	GSH 0 mM				
	MitoTEMPO				P
	0 μ m	25 μ M	50 μ M	100 μ M	
Motilidade	74.41 \pm 2.41 ^{ab}	78.65 \pm 1.69 ^a	67.94 \pm 2.68 ^b	73.35 \pm 2.25 ^{ab}	0.0159
Lentos	11.76 \pm 1.01 ^a	11.88 \pm 0.94 ^a	9.06 \pm 0.66 ^b	12.53 \pm 0.80 ^a	0.03
Estáticos	25.59 \pm 2.41 ^{ab}	21.35 \pm 1.69 ^b	32.06 \pm 2.68 ^a	26.65 \pm 2.25 ^{ab}	0.0166

Resultados descritos como média \pm SEM (erro padrão da média).^{a,b}: letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0.05$).

Observou-se ainda que, na ausência do GSH, houve aumento na porcentagem de células com marcação de estresse oxidativo e lesão de membrana plasmática (CRPPIP) no grupo controle em relação aos tratados e maior porcentagem de células sem marcação de estresse, mas com lesão de membrana plasmática (CRNPIP) nos grupos tratados em relação ao controle (tabela 3).

Tabela 3 – Efeito das diferentes doses de MitoTEMPO, na ausência de GSH, no estresse oxidativo e lesão de membrana plasmática. Resultados expressos em porcentagem (%).

GSH 0 mM					
Variável	MitoTEMPO				P
	0 μm	25 μM	50 μM	100 μM	
CRPPIP	2.71 \pm 0.77 ^a	1.19 \pm 0.27 ^b	1.04 \pm 0.19 ^b	1.16 \pm 0.33 ^b	0.0432
CRPPIN	4.89 \pm 1.60	1.87 \pm 0.63	1.55 \pm 0.44	2.14 \pm 0.83	0.2292
CRNPIP	58.94 \pm 2.01 ^b	63.67 \pm 1.78 ^{ab}	63.91 \pm 1.48 ^a	65.98 \pm 1.46 ^a	0.0396
CRNPIN	33.44 \pm 2.37	33.28 \pm 1.84	33.51 \pm 1.50	30.73 \pm 1.87	0.714

Resultados descritos como média \pm SEM (erro padrão da média).^{a,b}: letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0.05$).

As tabelas com todos os resultados dos efeitos das doses de MitoTEMPO em cada GSH estão disponibilizadas no apêndice 2, tabelas 8 e 9. Resultados descritos como média \pm SEM (erro padrão da média).

7. DISCUSSÃO

O estresse oxidativo é um dos grandes responsáveis pela queda da qualidade espermática pós-criopreservação devido à formação excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROS) (LAMIRANDE et al., 1997). Elas são formadas principalmente na mitocôndria, no decorrer do metabolismo do oxigênio para a formação de energia na forma de ATP durante a fosforilação oxidativa (LAMBERT; BRAND, 2009). O espermatozoide possui mecanismos antioxidantes para o combate da formação das EROS, porém existem limitações. Nesse estudo avaliamos os efeitos da suplementação da GSH e do antioxidante sintético MitoTEMPO no diluidor para a criopreservação de sêmen bovino.

Diversos estudos avaliaram o efeito da suplementação de GSH, um importante mecanismo de defesa contra as EROS na inativação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), em diluidores para a criopreservação e refrigeração do sêmen de diferentes espécies. No entanto, estes estudos reportam tanto efeitos positivos quanto negativos da adição de GSH (ANDERSEN et al., 2018; DAGHIGH-KIA et al., 2014; GANGWAR et al., 2018; LUCIO et al., 2016b). Em condições fisiológicas, as células aeróbicas dependem de uma condição pró-oxidante para desempenhar suas funções. Assim, quando os níveis de agentes redutores, como GSH, estão elevados, pode ocorrer um quadro de estresse redutivo, o qual pode inibir eventos fisiológicos dependentes de oxidação (XIAO; LOSCALZO, 2020). O trabalho de Zhang (2012), demonstrou, em células somáticas, *in vitro*, que o excesso de GSH causou oxidação mitocondrial e citotoxicidade em níveis reduzidos de EROS, evidenciando o estresse redutivo, com aumento da GSH dissociado do excesso de EROS e associado a morte celular. Efeito semelhante pode ter ocorrido no presente estudo, já que não houve aumento expressivo na formação de EROS e aumento na susceptibilidade ao estresse oxidativo, mas uma menor porcentagem de células com alta atividade mitocondrial, redução da linearidade e menor porcentagem de células com membranas íntegras com a presença de GSH. Tais efeitos indesejados podem indicar uma suplementação excessiva desta molécula.

Quando desempenha sua função antioxidante, a GSH é oxidada a GSSG, que é novamente reciclada a GSH pela glutathione redutase (GR) na dependência de NADPH (RIBAS; GARCÍA-RUIZ; FERNÁNDEZ-CHECA, 2014). Uma fonte significativa de NADPH mitocondrial é o nucleotídeo nicotinamida transidrogenase, que obtém elétrons do NADH para reduzir o $NADP^+$ em NADPH. Este, por sua vez, é um doador de elétrons

para o complexo I da cadeia transportadora de elétrons (NELSON; COX, 2014). É possível que o excesso de GSH tenha afetado o balanço NADPH/NADP⁺ e NADH/NAD⁺, interferindo no transporte de elétrons entre os complexos da cadeia transportadora de elétrons. Desta forma, o transporte seria insuficiente para suprir a demanda de ATP, refletindo na motilidade reduzida observada nas amostras deste estudo. Outro indício que suportaria esta hipótese seria a redução na porcentagem de células com alta atividade mitocondrial e aumento da porcentagem de células com baixa e ausência de atividade mitocondrial observados, além do aumento da porcentagem de células com baixo potencial de membrana mitocondrial.

Considerando-se os resultados observados, o possível excesso de GSH e outros agentes redutores podem ter levado a uma condição estresse redutivo em parte dos espermatozoides das amostras avaliadas. Esses agentes podem causar dano por meio da inibição de mecanismos oxidativos fisiológicos, promovendo injúria tecidual ou um paradoxal aumento de EROS como sugerido por Halliwell (2000). Ainda que de modo geral o sistema não apresente níveis altos de EROS, existe uma porcentagem de células que estão com sua função prejudicada e produzem fatores pró-oxidativos que são liberados no meio. Um exemplo são as células com baixa atividade mitocondrial, que tem falha no transporte de elétrons e consequente redução na produção de ATP, mas que produzem EROS que, no meio, podem agravar os danos oxidativos (BLUMER et al., 2008, 2012; LUCIO et al., 2016b). Tendo isso em vista, o aumento da porcentagem de células baixa atividade mitocondrial na dose 50 μ M com GSH em relação a mesma dose sem GSH, pode ter agravado os danos em membrana pela maior liberação de EROS, refletindo em uma menor porcentagem de células com membranas plasmática e acrossomal íntegras. Apesar de não haver diferença significativa, a porcentagem de espermatozoides com baixa atividade mitocondrial foi maior em todos os grupos na presença do GSH comparado aos mesmos grupos na ausência dele, e a porcentagem de células com acrossoma lesionado e membrana plasmática íntegra acompanhou esse padrão. Do mesmo modo, apesar de só haver diferença entre os grupos com e sem GSH na dose de 100 μ M de MitoTEMPO, numericamente foi observada uma maior porcentagem de espermatozoides com baixo potencial de membrana mitocondrial nas amostras em todas as concentrações de MitoTEMPO com GSH.

Na avaliação de cinética espermática, além da redução da motilidade total com a adição de GSH na dose 25 μ M de MitoTEMPO, foi observado aumento na amplitude de

movimento lateral da cabeça e redução na linearidade nas amostras tratadas com GSH na dose de 50 μ M de MitoTEMPO. Esses resultados levantam a possibilidade da presença de um início de capacitação espermática desencadeada pelo GSH em parte dos espermatozoides nas amostras. Estudos demonstram que neste processo, os espermatozoides apresentam menor linearidade aumento da amplitude do movimento lateral da cabeça e redução do movimento progressivo (LEITE et al., 2022; MORTIMER; MORTIMER, 1990; SUAREZ, 2008). Desta forma, possivelmente, disfunções mitocondriais causadas pelo excesso de GSH, podem ter levado a uma diminuição na produção de ATP e aumento no estresse oxidativo que levaram, respectivamente, a uma diminuição na motilidade e a lesão dos espermatozoides e início de um processo de capacitação precoce.

Outro antioxidante com ação avaliada nesse estudo foi o MitoTEMPO, uma molécula sintética análoga a superóxido dismutase (SOD), conjugada com o cátion lipofílico trifenilfosfônio (TPP), que confere especificidade a mitocôndria por atravessar facilmente a sua membrana interna. Há poucos estudos avaliando a suplementação de MitoTEMPO em diluidores na criopreservação espermática. Entre estes, apesar de avaliações em espécies como bubalinos, ovinos, aves, suínos e humanos (KUMAR et al., 2022; LU et al., 2018; ZAREI et al., 2021; ZHANG et al., 2019b), não há estudos sobre a suplementação desta molécula em diluidores para a criopreservação de espermatozoides de bovinos. Distintamente dos estudos utilizando suplementação com MitoTEMPO, no presente estudo se optou pela associação com GSH visando proteger as células de um possível aumento de peróxido de hidrogênio que pode ocorrer na presença de MitoTEMPO, evitando também a formação de uma ERO ainda mais deletéria, o radical hidroxila.

Os resultados observados neste estudo demonstraram que não houve melhora do *status* funcional dos espermatozoides tratados com as doses de MitoTEMPO utilizadas durante a criopreservação. Em relação às doses utilizadas, a dose de 25 μ M de MitoTEMPO apresentou maior motilidade total em comparação a dose de 50 μ M, no entanto, não houve diferença em relação ao grupo controle. Na análise com a sonda CellRox, observamos maior porcentagem de células com marcação de estresse e membrana plasmática lesionada no grupo controle quando comparado com os grupos tratados somente com MitoTEMPO, isso pode indicar um possível efeito benéfico dessa

molécula na proteção contra o estresse oxidativo, evitando maior formação de EROS e consequentemente menor lesão em membrana.

É importante ressaltar que as amostras de sêmen utilizadas nesse estudo foram de animais de central de coleta de sêmen, ou seja, de animais com alto índice de seleção genética, com histórico de fertilidade conhecido, alta qualidade espermática e ejaculados resistentes ao processo de criopreservação. Durante as análises notou-se que dos 17 animais, no grupo controle apenas 5 animais possuíam motilidade total menor do que 70% após a criopreservação. Portanto, é possível que os tratamentos utilizados neste estudo não apresentaram a eficiência esperada por terem sido realizadas em amostras que não estavam num quadro de estresse oxidativo, o que poderia levar a redução da qualidade espermática.

Os resultados obtidos neste estudo, principalmente considerando-se que este é o primeiro a ser realizado em amostras de sêmen bovino, sugerem a realização de novos estudos com suplementação de diluidores com MitoTEMPO e sem adição de GSH, em amostras de animais com qualidade seminal inferior e/ou maior suscetibilidade ao processo de criopreservação. Em relação às doses utilizadas, deve-se considerar concentrações mais próximas de 25 μM , na qual se observou resultados que podem levar à melhora de parâmetros funcionais dos espermatozoides, como por exemplo doses nas concentrações de 15, 20, 25 e 30 μM .

8. CONCLUSÃO

A suplementação do meio de criopreservação espermática com os antioxidantes MitoTEMPO e glutathiona reduzida (GSH), isoladamente ou em conjunto, não melhoram a qualidade seminal pós descongelamento nas doses utilizadas no estudo.

9. REFERÊNCIAS

ABIEC. **Beef Report: Perfil da Pecuária no Brasil**. Brasília.

AGARWAL, A. et al. Effect of Oxidative Stress on Male Reproduction. **The World Journal of Men's Health**, v. 32, n. 1, p. 1–17, 2014.

AITKEN, J. R.; ROMAN, S. D. Antioxidant systems and oxidative stress in the testes. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 1, n. 1, p. 15–24, 2008.

AITKEN, R. J. et al. Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function. **Journal of Cell Science**, v. 108, n. 5, p. 2017–2025, 1995.

AITKEN, R. J. et al. Redox activity associated with the maturation and capacitation of mammalian spermatozoa. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 36, n. 8, p. 994–1010, 2004.

AITKEN, R. J. et al. Causes and consequences of oxidative stress in Spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, p. 1–10, 2016.

AITKEN, R. J.; CURRY, B. J. Redox Regulation of Human Sperm Function: From the Physiological Control of Sperm Capacitation to the Etiology of Infertility and DNA Damage in the Germ Line. **Antioxidants & Redox signaling**, v. 14, n. 3, p. 367–381, 2011.

ALVAREZ, J. G. et al. Spontaneous Lipid Peroxidation and Production of Hydrogen Peroxide and Superoxide in Human Spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 8, n. 5, p. 338–348, 1987.

ANDERSEN, A. H. et al. Effect of reduced glutathione (GSH) supplementation to Tris-egg yolk extender on chilled semen variables of dogs. **Animal Reproduction Science**, v. 198, p. 145–153, 1 nov. 2018.

BANDAY, M. N. et al. Use of antioxidants reduce lipid peroxidation and improve quality of crossbred ram sperm during its cryopreservation. **Cryobiology**, v. 74, p. 25–30, 2017.

BILODEAU, J. F. et al. Thiols prevent H₂O₂-mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. **Theriogenology**, v. 56, n. 2, p. 275–286, 2001.

BLUMER, C. G. et al. Sperm nuclear DNA fragmentation and mitochondrial activity in men with varicocele. **Fertility and Sterility**, v. 90, n. 5, p. 1716–1722, 2008.

BLUMER, C. G. et al. Effect of varicocele on sperm function and semen oxidative stress. **BJU International**, v. 109, n. 2, p. 259–265, 2012.

CÂMARA, D. R. et al. Effects of antioxidants and duration of pre-freezing equilibration on frozen-thawed ram semen. **Theriogenology**, v. 76, n. 2, p. 342–350, 2011.

CELEGHINI, E. C. C. et al. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 5, p. 479–488, 2007.

CUNHA, F. M. et al. Mild Mitochondrial Uncoupling as a Therapeutic Strategy. **Current Drug Targets**, v. 12, n. 6, p. 783–789, 2011.

DAGHIGH-KIA, H. et al. Effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extracts and glutathione antioxidants on bull semen quality after cryopreservation. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 12, n. 1, p. 98–105, 2014.

DE LAMIRANDE, E. et al. Involvement of reactive oxygen species in human sperm arcosome reaction induced by A23187, lysophosphatidylcholine, and biological fluid ultrafiltrates. **Journal of Andrology**, v. 19, n. 5, p. 585–594, 1998.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 14, n. 2, p. 157–166, 1993.

FANG, L. et al. Inhibition of ROS production through mitochondria-targeted antioxidant and mitochondrial uncoupling increases post-thaw sperm viability in yellow catfish. **Cryobiology**, v. 69, n. 3, p. 386–393, 2014.

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, p. 61–68, 1997.

GANGWAR, C. et al. Effect of reduced glutathione supplementation on cryopreservation induced sperm cryoinjuries in Murrah bull semen. **Animal Reproduction Science**, v. 192, p. 171–178, 1 maio 2018.

GAO, D.; CRITSER, A. K. Mechanisms of Cryoinjury in Living Cells. **ILAR Journal**, v. 41, n. 4, p. 187–196, 2000.

GUERRA, MARIA M. P. et al. Uso de antioxidantes no sêmen ovino. **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 354–364, 2012.

GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R. Effects of reactive oxygen species on sperm function. **Theriogenology**, v. 78, p. 1700–1708, nov. 2012.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **The Lancet**, v. 355, n. 9210, p. 1179–1180, 2000.

HAMMERSTEDT, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of Mammalian Sperm : What We Ask Them to Survive. **Journal of Andrology**, v. 11, n. 1, p. 73–88, 1990.

HOLT, W. V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v. 53, n. 1, p. 47–58, 2000.

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.

KOPPERS, A. J. et al. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 93, n. 8, p. 3199–3207, 2008.

KUMAR, A. et al. Strategies to Minimize Various Stress-Related Freeze-Thaw Damages during Conventional Cryopreservation of Mammalian Spermatozoa. **Biopreservation and Biobanking**, v. 17, n. 6, p. 603–612, 1 dez. 2019.

KUMAR, A. et al. Supplementation of Mito TEMPO and acetovanillone in semen extender improves freezability of buffalo spermatozoa. **Andrology**, v. 10, n. 4, p. 775–788, 1 maio 2022.

LAMBERT, A. J.; BRAND, M. D. Reactive oxygen species production by mitochondria. **Mitochondrial DNA, Methods and Protocols**, v. 554, p. 165–181, 2009.

LAMIRANDE, E. DE et al. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v. 2, p. 48–54, 1997.

LANDAU, E. C.; SIMEÃO, R. M.; NETO, F. DA C. M. Evolução da Área Ocupada por Pastagens. Em: LANDAU, E. C. et al. (Eds.). **Dinâmica da produção agropecuária e da paisagem natural no Brasil nas últimas décadas**. 1. ed. Brasília: Embrapa, 2020. v. 3p. 1555–1580.

LEITE, R. F. et al. Sperm function and oxidative status: Effect on fertility in *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls when semen is used for fixed-time artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 237, n. 106922, 1 fev. 2022.

LOSANO, J. D. DE A. et al. Deleterious Effect of High Carnosine Concentrations in Extenders During Sperm Cryopreservation in Dogs. **Journal of Veterinary Andrology**, v. 2, n. December, p. 60–67, 2017a.

LOSANO, J. D. DE A. et al. Deleterious Effect of High Carnosine Concentrations in Extenders During Sperm Cryopreservation in Dogs. **Journal of Veterinary Andrology**, v. 2, n. 2, p. 60–67, 2017b.

LU, X. et al. Mitochondria-targeted antioxidant MitoTEMPO improves the post-thaw sperm quality. **Cryobiology**, v. 80, p. 26–29, 1 fev. 2018.

LUCIO, C. F. et al. Effect of reduced glutathione (GSH) in canine sperm cryopreservation: In vitro and in vivo evaluation. **Cryobiology**, v. 72, n. 2, p. 135–140, abr. 2016a.

LUCIO, C. F. et al. Effect of reduced glutathione (GSH) in canine sperm cryopreservation: In vitro and in vivo evaluation. **Cryobiology**, v. 72, n. 2, p. 135–140, 1 abr. 2016b.

MARTINDALE, J. L.; HOLBROOK, N. J. Cellular response to oxidative stress: Signaling for suicide and survival. **Journal of Cellular Physiology**, v. 192, n. 1, p. 1–15, 2002.

MORTIMER, S. T.; MORTIMER, D. Kinematics of Human Spermatozoa Incubated Under Capacitating Conditions. **Journal of Andrology**, v. 11, n. 3, p. 195–203, 1990.

MURPHY, M. P.; SMITH, R. A. J. Targeting Antioxidants to Mitochondria by Conjugation to Lipophilic Cations. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 47, n. 1, p. 629–656, 2007.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. [s.l: s.n.]. v. 6

NETO, R. P.; REZENDE, V. T.; GAMEIRO, A. H. **Avanços da sustentabilidade da pecuária de corte brasileira.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/370576247>>.

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.** [s.l: s.n.].

NICHI, M. et al. 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. et al. 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, 2007a.

NICHI, M. et al. 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, 15 jan. 2007b.

NICHI, M. **Efeito do tratamento com antioxidantes e ácidos graxos poli-insaturados em amostras espermáticas epididimárias de touros.** [s.l: s.n.].

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

O'CONNELL, M.; MCCLURE, N.; LEWIS, S. E. M. The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. **Human Reproduction**, v. 17, n. 3, p. 704–709, 2002.

O'FLAHERTY, C. The Enzymatic Antioxidant System of Human Spermatozoa. **Advances in Andrology**, v. 2014, p. 1–15, 10 jul. 2014.

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.

OLDENHOF, H. et al. Osmotic stress and membrane phase changes during freezing of stallion sperm: Mode of action of cryoprotective agents. **Biology of Reproduction**, v. 88, n. 3, p. 1–11, mar. 2013.

RIBAS, V.; GARCÍA-RUIZ, C.; FERNÁNDEZ-CHECA, J. C. Glutathione and mitochondria. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, 2014.

ROSS, M. F. et al. Lipophilic triphenylphosphonium cations as tools in mitochondrial bioenergetics and free radical biology. **Biokhimiya**, v. 70, n. 2, p. 273–283, 2005.

SARIÖZKAN, S. et al. The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. **Cryobiology**, v. 58, n. 2, p. 134–138, 2009a.

SARIÖZKAN, S. et al. The influence of cysteine and taurine on microscopic-oxidative stress parameters and fertilizing ability of bull semen following cryopreservation. **Cryobiology**, v. 58, n. 2, p. 134–138, abr. 2009b.

SCHOBER, D. et al. Influence of cryopreservation on mitochondrial functions in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 68, n. 5, p. 745–754, 2007.

SOULE, B. P. et al. The chemistry and biology of nitroxide compounds. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 42, n. 11, p. 1632–1650, 2007.

SUAREZ, S. S. Control of hyperactivation in sperm. **Human Reproduction Update**, v. 14, n. 6, p. 647–657, 2008.

TAYLOR, K. et al. Effect of antioxidant supplementation of cryopreservation medium on post-thaw integrity of human spermatozoa. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 18, n. 2, p. 184–189, 2009.

TESARIK, J.; GRECO, E.; MENDOZA, C. Late, but not early, paternal effect on human embryo development is related to sperm DNA fragmentation. **Human Reproduction**, v. 19, n. 3, p. 611–615, 2004.

THOMSON, L. K. et al. 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.

TRNKA, J. et al. Antioxidant properties of MitoTEMPOL and its hydroxylamine. **Free Radical Research**, v. 43, n. 1, p. 4–12, 2009.

VERNET, P.; AITKEN, R. J.; DREVET, J. R. Antioxidant strategies in the epididymis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 216, p. 31–39, 2004.

XIAO, W.; LOSCALZO, J. Metabolic Responses to Reductive Stress. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 32, n. 18, p. 1330–1347, 20 jun. 2020.

ZAPZALKA, D. M.; REDMON, J. B.; PRYOR, J. L. A survey of oncologists regarding sperm cryopreservation and assisted reproductive techniques for male cancer patients. **Cancer**, v. 86, p. 1812–1817, 1999.

ZAREI, F. et al. Supplementation of ram's semen extender with Mito-TEMPO I: Improvement in quality parameters and reproductive performance of cooled-stored semen. **Cryobiology**, v. 98, p. 215–218, 1 fev. 2021.

ZHANG, H. et al. Glutathione-dependent reductive stress triggers mitochondrial oxidation and cytotoxicity. **The FASEB Journal**, v. 26, n. 4, p. 1442–1451, abr. 2012.

ZHANG, X. et al. Cryobiology Mito-Tempo alleviates cryodamage by regulating intracellular oxidative metabolism in spermatozoa from asthenozoospermic patients. **Cryobiology**, v. 91, n. 105, p. 18–22, 2019a.

ZHANG, X. et al. Mito-Tempo alleviates cryodamage by regulating intracellular oxidative metabolism in spermatozoa from asthenozoospermic patients. **Cryobiology**, v. 91, p. 18–22, 1 dez. 2019b.

10. APÊNDICES

Apêndice 1 – Tabelas dos efeitos do GSH em cada dose de MitoTEMPO

Tabela 4 – Efeito do GSH sem MitoTEMPO

Variáveis	MitoTEMPO 0 µM		
	GSH 0 mM	GSH 5 mM	P
VAP	74.04 ± 1.59	73.11 ± 1.60	0.6807
VSL	60.17 ± 1.30	59.42 ± 1.28	0.685
VCL	118.72 ± 3.35	116.94 ± 3.94	0.7318
ALH	5.81 ± 0.20	5.74 ± 0.22	0.8313
BCF	24.25 ± 0.65	22.90 ± 0.76	0.1863
STR	82.00 ± 1.18	82.06 ± 1.42	0.9748
LIN	53.47 ± 1.47	53.65 ± 2.11	0.9711
Motilidade	74.41 ± 2.41	69.71 ± 3.52	0.3049
Progressiva	40.24 ± 2.38	37.76 ± 2.51	0.4801
Rápidos	49.71 ± 2.65	47.06 ± 3.09	0.5204
Médios	12.76 ± 1.12	12.18 ± 1.04	0.7156
Lentos	11.76 ± 1.01	10.59 ± 1.08	0.4315
Estáticos	25.59 ± 2.41	30.29 ± 3.52	0.3338
EN	80.53 ± 1.89	79.06 ± 1.98	0.5931
DAB I	44.88 ± 3.27	38.82 ± 3.73	0.151
DAB II	39.65 ± 2.35	38.00 ± 2.10	0.5384
DAB III	7.41 ± 1.22	9.71 ± 1.19	0.1876
DAB IV	8.18 ± 1.07	13.47 ± 1.46	0.012
CRPPIP	2.71 ± 0.77	1.33 ± 0.40	0.025
CRPPIN	4.89 ± 1.60	2.34 ± 0.96	0.0757
CRNPIP	58.94 ± 2.01	63.75 ± 1.71	0.0776
CRNPIN	33.44 ± 2.37	32.56 ± 1.72	0.7669
ALML	32.53 ± 1.70	35.18 ± 1.73	0.2816
ALMI	5.47 ± 0.76	5.66 ± 0.54	0.5621
AIML	27.89 ± 1.78	28.86 ± 1.59	0.627
AIMI	34.13 ± 1.72	30.29 ± 1.78	0.1303
Alto PMM	22.52 ± 2.73	18.94 ± 2.85	0.3076

Baixo PMM	46.06 ± 1.86	48.31 ± 2.66	0.4931
PMM intermediário	31.88 ± 1.84	33.41 ± 1.95	0.5707
TBARS	19.02 ± 1.49	18.62 ± 1.70	0.7767

Resultados descritos como média ± SEM (erro padrão da média) e valor de p. Valores de p < 0.05 representam que houve diferença estatística significativa (em vermelho). VAP (velocidade média de percurso, µm/s), VSL (velocidade retilínea, µm/s), VCL (velocidade curvilínea, µm/s), ALH (amplitude do movimento lateral da cabeça, µm), BCF (frequência de batimento cruzado, Hz) STR (retilinearidade, %), LIN (linearidade, %), DAB I (alta atividade mitocondrial, %), DAB II (atividade mitocondrial intermediária, %), DAB III (baixa atividade mitocondrial, %), DAB IV (ausência de atividade mitocondrial, %), PMM (potencial de membrana mitocondrial, %), CRPPIP (cellrox positivo, PI positivo), CRPPIN (cellrox positivo, PI negativo), CRNPIP (cellrox negativo, PI positivo), CRNPIN (cellrox negativo, PI negativo), ALML (acrossoma lesionado, membrana plasmática lesionada), ALMI (acrossoma lesionado, membrana plasmática íntegra), AIML (acrossoma íntegro, membrana plasmática lesionada), AIMI (acrossoma íntegro, membrana plasmática íntegra), TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico).

Tabela 5 – Efeito do GSH na dose 25 μ M de MitoTEMPO

MitoTEMPO 25 μM			
	GSH 0 mM	GSH 5 mM	P
VAP	73.63 \pm 1.74	71.05 \pm 1.67	0.2942
VSL	60.09 \pm 1.30	58.45 \pm 1.62	0.4394
VCL	116.68 \pm 3.74	113.39 \pm 2.40	0.4655
ALH	5.73 \pm 0.21	5.69 \pm 0.15	0.8719
BCF	24.46 \pm 0.65	22.62 \pm 0.66	0.0555
STR	82.29 \pm 1.11	82.71 \pm 0.78	0.7638
LIN	54.29 \pm 1.64	54.00 \pm 1.33	0.9394
Motilidade	78.65 \pm 1.69	71.47 \pm 2.08	0.0109
Progressiva	42.88 \pm 2.21	37.94 \pm 2.58	0.156
Rápidos	52.76 \pm 2.45	45.94 \pm 2.77	0.0741
Médios	13.94 \pm 1.25	14.41 \pm 1.08	0.734
Lentos	11.88 \pm 0.94	11.35 \pm 0.65	0.646
Estáticos	21.35 \pm 1.69	28.53 \pm 2.08	0.0096
EN	76.06 \pm 2.09	79.12 \pm 1.45	0.26
DAB I	47.47 \pm 2.51	42.24 \pm 3.08	0.1331
DAB II	36.29 \pm 1.98	37.65 \pm 1.89	0.6191
DAB III	6.71 \pm 0.80	8.88 \pm 1.35	0.1783
DAB IV	9.53 \pm 0.85	11.24 \pm 0.82	0.1428
CRPIP	1.19 \pm 0.27	1.21 \pm 0.36	0.6367
CRPIN	1.87 \pm 0.63	2.05 \pm 0.92	0.8904
CRNPIP	63.67 \pm 1.78	63.02 \pm 1.47	0.7807
CRNPIN	33.28 \pm 1.84	33.71 \pm 1.51	0.8581
ALML	35.31 \pm 1.72	36.32 \pm 1.53	0.6611
ALMI	4.98 \pm 0.47	7.45 \pm 0.59	0.0018
AIML	29.24 \pm 1.42	27.10 \pm 1.28	0.2543
AIMI	30.47 \pm 1.68	29.13 \pm 1.32	0.5345
Alto PMM	21.87 \pm 3.34	21.19 \pm 2.74	0.9393
Baixo PMM	45.49 \pm 2.38	47.68 \pm 1.86	0.4738
PMM intermediário	33.16 \pm 3.29	31.58 \pm 2.36	0.8702
TBARS	17.52 \pm 1.80	18.34 \pm 2.02	0.7626

Resultados descritos como média \pm SEM (erro padrão da média) e valor de p. Valores de $p < 0.05$ representam que houve diferença estatística significativa (em vermelho). VAP (velocidade média de percurso, $\mu\text{m/s}$), VSL (velocidade retilínea, $\mu\text{m/s}$), VCL (velocidade curvilínea, $\mu\text{m/s}$), ALH (amplitude do movimento lateral da cabeça, μm), BCF (frequência de batimento cruzado, Hz) STR (retilinearidade, %), LIN (linearidade, %), DAB I (alta atividade mitocondrial, %), DAB II (atividade mitocondrial intermediária, %), DAB III (baixa atividade mitocondrial, %), DAB IV (ausência de atividade mitocondrial, %), PMM (potencial de membrana mitocondrial, %), CRPPIP (cellrox positivo, PI positivo), CRPPIN (cellrox positivo, PI negativo), CRNPIP (cellrox negativo, PI positivo), CRNPIN (cellrox negativo, PI negativo), ALML (acrossoma lesionado, membrana plasmática lesionada), ALMI (acrossoma lesionado, membrana plasmática íntegra), AIML (acrossoma íntegro, membrana plasmática lesionada), AIMI (acrossoma íntegro, membrana plasmática íntegra), TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico).

Tabela 6 – Efeito do GSH na dose 50 μ M de MitoTEMPO

	MitoTEMPO 50 μM		
	GSH 0 mM	GSH 5 mM	P
VAP	72.64 \pm 1.75	74.78 \pm 1.97	0.4226
VSL	60.20 \pm 1.26	59.51 \pm 1.37	0.7138
VCL	114.44 \pm 3.46	123.65 \pm 3.80	0.0826
ALH	5.52 \pm 0.18	6.08 \pm 0.17	0.0301
BCF	23.18 \pm 0.82	23.48 \pm 0.58	0.7636
STR	83.59 \pm 0.96	80.53 \pm 1.05	0.0389
LIN	55.18 \pm 1.31	51.06 \pm 1.30	0.0331
Motilidade	67.94 \pm 2.68	72.59 \pm 2.07	0.2
Progressiva	39.47 \pm 2.60	37.00 \pm 1.86	0.4453
Rápidos	46.94 \pm 3.04	47.47 \pm 2.44	0.8929
Médios	11.94 \pm 0.91	12.18 \pm 1.12	0.9198
Lentos	9.06 \pm 0.66	12.82 \pm 0.71	0.0005
Estáticos	32.06 \pm 2.68	27.41 \pm 2.07	0.235
EN	77.71 \pm 2.46	80.06 \pm 1.95	0.4974
DAB I	51.59 \pm 3.22	41.41 \pm 2.99	0.0288
DAB II	34.35 \pm 2.38	37.59 \pm 1.82	0.326
DAB III	6.35 \pm 1.00	10.29 \pm 1.36	0.0263
DAB IV	7.71 \pm 0.83	10.71 \pm 0.99	0.0209
CRPPIP	1.04 \pm 0.19	1.17 \pm 0.24	0.8887
CRPPIN	1.55 \pm 0.44	2.19 \pm 0.62	0.5875
CRNPIP	63.91 \pm 1.48	65.48 \pm 2.22	0.5603
CRNPIN	33.51 \pm 1.50	31.14 \pm 1.95	0.343
ALML	35.92 \pm 2.10	38.56 \pm 1.75	0.3416
ALMI	5.41 \pm 0.60	7.12 \pm 0.52	0.022
AIML	27.82 \pm 1.53	28.30 \pm 1.38	0.7384
AIMI	30.85 \pm 1.76	26.01 \pm 1.29	0.0347
Alto PMM	19.22 \pm 2.97	23.35 \pm 2.80	0.7783
Baixo PMM	46.78 \pm 2.44	51.26 \pm 2.22	0.1832
PMM intermediário	34.41 \pm 3.27	25.95 \pm 1.28	0.0528
TBARS	20.25 \pm 2.95	21.78 \pm 3.23	0.5575

Resultados descritos como média \pm SEM (erro padrão da média) e valor de p. Valores de $p < 0.05$ representam que houve diferença estatística significativa (em vermelho). VAP (velocidade média de percurso, $\mu\text{m/s}$), VSL (velocidade retilínea, $\mu\text{m/s}$), VCL (velocidade curvilínea, $\mu\text{m/s}$), ALH (amplitude do movimento lateral da cabeça, μm), BCF (frequência de batimento cruzado, Hz) STR (retilinearidade, %), LIN (linearidade, %), DAB I (alta atividade mitocondrial, %), DAB II (atividade mitocondrial intermediária, %), DAB III (baixa atividade mitocondrial, %), DAB IV (ausência de atividade mitocondrial, %), PMM (potencial de membrana mitocondrial, %), CRPPIP (cellrox positivo, PI positivo), CRPPIN (cellrox positivo, PI negativo), CRNPIP (cellrox negativo, PI positivo), CRNPIN (cellrox negativo, PI negativo), ALML (acrossoma lesionado, membrana plasmática lesionada), ALMI (acrossoma lesionado, membrana plasmática íntegra), AIML (acrossoma íntegro, membrana plasmática lesionada), AIMI (acrossoma íntegro, membrana plasmática íntegra), TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico).

Tabela 7 – Efeito do GSH na dose 100 μ M de MitoTEMPO

	MitoTEMPO 100 μM		
	GSH 0 mM	GSH 5 mM	P
VAP	71.34 \pm 1.73	72.99 \pm 2.13	0.5516
VSL	59.18 \pm 1.33	59.12 \pm 1.43	0.9785
VCL	112.92 \pm 3.79	116.70 \pm 4.28	0.5131
ALH	5.53 \pm 0.19	5.83 \pm 0.18	0.262
BCF	24.78 \pm 0.58	23.31 \pm 0.62	0.0907
STR	83.47 \pm 1.05	82.00 \pm 1.50	0.4291
LIN	55.18 \pm 1.75	53.71 \pm 1.79	0.5326
Motilidade	73.35 \pm 2.25	70.94 \pm 2.34	0.4555
Progressiva	39.00 \pm 2.30	36.24 \pm 2.41	0.4128
Rápidos	46.41 \pm 2.49	45.41 \pm 2.45	0.7764
Médios	14.29 \pm 1.53	13.59 \pm 1.44	0.7414
Lentos	12.53 \pm 0.80	11.88 \pm 0.92	0.6001
Estáticos	26.65 \pm 2.25	29.06 \pm 2.34	0.4193
EN	78.94 \pm 1.62	78.88 \pm 2.02	0.9728
DAB I	51.47 \pm 2.99	44.24 \pm 3.38	0.0894
DAB II	33.41 \pm 2.31	36.47 \pm 1.79	0.3472
DAB III	6.65 \pm 1.13	8.71 \pm 1.42	0.2653
DAB IV	8.47 \pm 0.97	10.59 \pm 1.27	0.2541
CRPIP	1.16 \pm 0.33	1.92 \pm 0.49	0.4687
CRPIN	2.14 \pm 0.83	3.56 \pm 0.83	0.5513
CRNPIP	65.98 \pm 1.46	64.85 \pm 1.24	0.558
CRNPIN	30.73 \pm 1.87	29.68 \pm 1.75	0.6842
ALML	35.88 \pm 1.75	36.47 \pm 1.82	0.8151
ALMI	5.00 \pm 0.61	7.03 \pm 0.57	0.0099
AIML	29.74 \pm 1.42	28.16 \pm 1.41	0.3965
AIMI	29.39 \pm 1.45	28.34 \pm 1.79	0.6519
Alto PMM	22.40 \pm 3.08	16.95 \pm 2.99	0.1844
Baixo PMM	46.69 \pm 2.14	53.34 \pm 2.26	0.0407
PMM intermediário	31.49 \pm 1.90	30.29 \pm 1.75	0.707
TBARS	17.96 \pm 1.29	19.23 \pm 1.92	0.8028

Resultados descritos como média \pm SEM (erro padrão da média) e valor de p. Valores de $p < 0.05$ representam que houve diferença estatística significativa (em vermelho). VAP (velocidade média de percurso, $\mu\text{m/s}$), VSL (velocidade retilínea, $\mu\text{m/s}$), VCL (velocidade curvilínea, $\mu\text{m/s}$), ALH (amplitude do movimento lateral da cabeça, μm), BCF (frequência de batimento cruzado, Hz) STR (retilinearidade, %), LIN (linearidade, %), DAB I (alta atividade mitocondrial, %), DAB II (atividade mitocondrial intermediária, %), DAB III (baixa atividade mitocondrial, %), DAB IV (ausência de atividade mitocondrial, %), PMM (potencial de membrana mitocondrial, %), CRPPIP (cellrox positivo, PI positivo), CRPPIN (cellrox positivo, PI negativo), CRNPIP (cellrox negativo, PI positivo), CRNPIN (cellrox negativo, PI negativo), ALML (acrossoma lesionado, membrana plasmática lesionada), ALMI (acrossoma lesionado, membrana plasmática íntegra), AIML (acrossoma íntegro, membrana plasmática lesionada), AIMI (acrossoma íntegro, membrana plasmática íntegra), TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico).

Apêndice 2 – Tabelas dos efeitos das diferentes doses de MitoTEMPO em cada dose de GSH

Tabela 8 – Efeito das doses de MitoTEMPO sem GSH

	GSH 0 mM				
	MitoTEMPO				
	0 µM	25 µM	50 µM	100 µM	P
VAP	74.04 ± 1.59	73.63 ± 1.74	72.64 ± 1.75	71.34 ± 1.73	0.6847
VSL	60.17 ± 1.30	60.09 ± 1.30	60.20 ± 1.26	59.18 ± 1.33	0.9337
VCL	118.72 ± 3.35	116.68 ± 3.74	114.44 ± 3.46	112.92 ± 3.79	0.6821
ALH	5.81 ± 0.20	5.73 ± 0.21	5.52 ± 0.18	5.53 ± 0.19	0.6579
BCF	24.25 ± 0.65	24.46 ± 0.65	23.18 ± 0.82	24.78 ± 0.58	0.3788
STR	82.00 ± 1.18	82.29 ± 1.11	83.59 ± 0.96	83.47 ± 1.05	0.6404
LIN	53.47 ± 1.47	54.29 ± 1.64	55.18 ± 1.31	55.18 ± 1.75	0.8315
Motilidade	74.41 ± 2.41 ^{ab}	78.65 ± 1.69 ^a	67.94 ± 2.68 ^b	73.35 ± 2.25 ^{ab}	0.0159
Progressiva	40.24 ± 2.38	42.88 ± 2.21	39.47 ± 2.60	39.00 ± 2.30	0.6619
Rápidos	49.71 ± 2.65	52.76 ± 2.45	46.94 ± 3.04	46.41 ± 2.49	0.3169
Médios	12.76 ± 1.12	13.94 ± 1.25	11.94 ± 0.91	14.29 ± 1.53	0.5973
Lentos	11.76 ± 1.01 ^a	11.88 ± 0.94 ^a	9.06 ± 0.66 ^b	12.53 ± 0.80 ^a	0.03
Estáticos	25.59 ± 2.41 ^{ab}	21.35 ± 1.69 ^b	32.06 ± 2.68 ^a	26.65 ± 2.25 ^{ab}	0.0166
EM	80.53 ± 1.89	76.06 ± 2.09	77.71 ± 2.46	78.94 ± 1.62	0.4642
DAB I	44.88 ± 3.27	47.47 ± 2.51	51.59 ± 3.22	51.47 ± 2.99	0.2987
DAB II	39.65 ± 2.35 ^a	36.29 ± 1.98 ^{ab}	34.35 ± 2.38 ^{ab}	33.41 ± 2.31 ^b	0.1833
DAB III	7.41 ± 1.22	6.71 ± 0.80	6.35 ± 1.00	6.65 ± 1.13	0.9075
DAB IV	8.18 ± 1.07	9.53 ± 0.85	7.71 ± 0.83	8.47 ± 0.97	0.5842
CRPPIP	2.71 ± 0.77 ^a	1.19 ± 0.27 ^b	1.04 ± 0.19 ^b	1.16 ± 0.33 ^b	0.0432
CRPPIN	4.89 ± 1.60	1.87 ± 0.63	1.55 ± 0.44	2.14 ± 0.83	0.2292
CRNPIP	58.94 ± 2.01 ^b	63.67 ± 1.78 ^{ab}	63.91 ± 1.48 ^a	65.98 ± 1.46 ^a	0.0396
CRNPIN	33.44 ± 2.37	33.28 ± 1.84	33.51 ± 1.50	30.73 ± 1.87	0.714
ALML	32.53 ± 1.70	35.31 ± 1.72	35.92 ± 2.10	35.88 ± 1.75	0.5078
ALMI	5.47 ± 0.76	4.98 ± 0.47	5.41 ± 0.60	5.00 ± 0.61	0.9519
AIML	27.89 ± 1.78	29.24 ± 1.42	27.82 ± 1.53	29.74 ± 1.42	0.644
AIMI	34.13 ± 1.72 ^a	30.47 ± 1.68 ^{ab}	30.85 ± 1.76 ^{ab}	29.39 ± 1.45 ^b	0.2223

Alta PMM	22.52 ± 2.73	21.87 ± 3.34	19.22 ± 2.97	22.40 ± 3.08	0.8362
Baixo PMM	46.06 ± 1.86	45.49 ± 2.38	46.78 ± 2.44	46.69 ± 2.14	0.9738
PMM intermediário	31.88 ± 1.84	33.16 ± 3.29	34.41 ± 3.27	31.49 ± 1.90	0.9851
TBARS	19.02 ± 1.49	17.52 ± 1.80	20.25 ± 2.95	17.96 ± 1.29	0.866

Resultados descritos como média ± SEM (erro padrão da média).^{a,b}: letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0.05$ – em vermelho). VAP (velocidade media de percurso, $\mu\text{m/s}$), VSL (velocidade retilínea, $\mu\text{m/s}$), VCL (velocidade curvilínea, $\mu\text{m/s}$), ALH (amplitude do movimento lateral da cabeça, μm), BCF (frequência de batimento cruzado, Hz) STR (retilinearidade, %), LIN (linearidade, %), DAB I (alta atividade mitocondrial, %), DAB II (atividade mitocondrial intermediária, %), DAB III (baixa atividade mitocondrial, %), DAB IV (ausência de atividade mitocondrial, %), PMM (potencial de membrana mitocondrial, %), CRPPIP (cellrox positivo, PI positivo), CRPPIN (cellrox positivo, PI negativo), CRNPIP (cellrox negativo, PI positivo), CRNPIN (cellrox negativo, PI negativo), ALML (acrossoma lesionado, membrana plasmática lesionada), ALMI (acrossoma lesionado, membrana plasmática íntegra), AIML (acrossoma íntegro, membrana plasmática lesionada), AIMI (acrossoma íntegro, membrana plasmática íntegra), TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico).

Tabela 9 – Efeito das doses de MitoTEMPO com 5 mM de GSH

	GSH 5 mM				
	MitoTEMPO				
	0 µM	25 µM	50 µM	100 µM	P
VAP	73.11 ± 1.60	71.05 ± 1.67	74.78 ± 1.97	72.99 ± 2.13	0.5707
VSL	59.42 ± 1.28	58.45 ± 1.62	59.51 ± 1.37	59.12 ± 1.43	0.9516
VCL	116.94 ± 3.94	113.39 ± 2.40	123.65 ± 3.80	116.7 ± 4.28	0.2593
ALH	5.74 ± 0.22	5.69 ± 0.15	6.08 ± 0.17	5.83 ± 0.18	0.4372
BCF	22.90 ± 0.76	22.62 ± 0.66	23.48 ± 0.58	23.31 ± 0.62	0.7879
STR	82.06 ± 1.42	82.71 ± 0.78	80.53 ± 1.05	82.00 ± 1.50	0.6402
LIN	53.65 ± 2.11	54.00 ± 1.33	51.06 ± 1.30	53.71 ± 1.79	0.5711
Motilidade	69.71 ± 3.52	71.47 ± 2.08	72.59 ± 2.07	70.94 ± 2.34	0.9447
Progressiva	37.76 ± 2.51	37.94 ± 2.58	37.00 ± 1.86	36.24 ± 2.41	0.9539
Rápidos	47.06 ± 3.09	45.94 ± 2.77	47.47 ± 2.44	45.41 ± 2.45	0.9447
Médios	12.18 ± 1.04	14.41 ± 1.08	12.18 ± 1.12	13.59 ± 1.44	0.47
Lentos	10.59 ± 1.08	11.35 ± 0.65	12.82 ± 0.71	11.88 ± 0.92	0.3172
Estáticos	30.29 ± 3.52	28.53 ± 2.08	27.41 ± 2.07	29.06 ± 2.34	0.967
E/N	79.06 ± 1.98	79.12 ± 1.45	80.06 ± 1.95	78.88 ± 2.02	0.967
DAB I	38.82 ± 3.73	42.24 ± 3.08	41.41 ± 2.99	44.24 ± 3.38	0.5754
DAB II	38.00 ± 2.10	37.65 ± 1.89	37.59 ± 1.82	36.47 ± 1.79	0.9037
DAB III	9.71 ± 1.19	8.88 ± 1.35	10.29 ± 1.36	8.71 ± 1.42	0.8193
DAB IV	13.47 ± 1.46	11.24 ± 0.82	10.71 ± 0.99	10.59 ± 1.27	0.4855
CRPPIP	1.33 ± 0.40	1.21 ± 0.36	1.17 ± 0.24	1.92 ± 0.49	0.8765
CRPPIN	2.34 ± 0.96	2.05 ± 0.92	2.19 ± 0.62	3.56 ± 0.83	0.7904
CRNPIP	63.75 ± 1.71	63.02 ± 1.47	65.48 ± 2.22	64.85 ± 1.24	0.739
CRNPIN	32.56 ± 1.72	33.71 ± 1.51	31.14 ± 1.95	29.68 ± 1.75	0.3936
ALML	35.18 ± 1.73	36.32 ± 1.53	38.56 ± 1.75	36.47 ± 1.82	0.5683
ALMI	5.66 ± 0.54 ^b	7.45 ± 0.59 ^a	7.12 ± 0.52 ^a	7.03 ± 0.57 ^{ab}	0.067
AIML	28.86 ± 1.59	27.10 ± 1.28	28.30 ± 1.38	28.16 ± 1.41	0.8634
AIMI	30.29 ± 1.78	29.13 ± 1.32	26.01 ± 1.29	28.34 ± 1.79	0.2687
Alta PMM	18.94 ± 2.85	21.19 ± 2.74	23.35 ± 2.80	16.95 ± 2.99	0.3043
Baixo PMM	48.31 ± 2.66	47.68 ± 1.86	51.26 ± 2.22	53.34 ± 2.26	0.2642
PMM intermediário	33.41 ± 1.95 ^a	31.58 ± 2.36 ^a	25.95 ± 1.28 ^b	30.29 ± 1.75 ^{ab}	0.0353

TBARS	18.62 ± 1.70	18.34 ± 2.02	21.78 ± 3.23	19.23 ± 1.92	0.7457
--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------

Resultados descritos como média ± SEM (erro padrão da média).^{a,b}: letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0.05$ – em vermelho). VAP (velocidade média de percurso, $\mu\text{m/s}$), VSL (velocidade retilínea, $\mu\text{m/s}$), VCL (velocidade curvilínea, $\mu\text{m/s}$), ALH (amplitude do movimento lateral da cabeça, μm), BCF (frequência de batimento cruzado, Hz) STR (retilinearidade, %), LIN (linearidade, %), DAB I (alta atividade mitocondrial, %), DAB II (atividade mitocondrial intermediária, %), DAB III (baixa atividade mitocondrial, %), DAB IV (ausência de atividade mitocondrial, %), PMM (potencial de membrana mitocondrial, %), CRPPIP (cellrox positivo, PI positivo), CRPPIN (cellrox positivo, PI negativo), CRNPIP (cellrox negativo, PI positivo), CRNPIN (cellrox negativo, PI negativo), ALML (acrossoma lesionado, membrana plasmática lesionada), ALMI (acrossoma lesionado, membrana plasmática íntegra), AIML (acrossoma íntegro, membrana plasmática lesionada), AIMI (acrossoma íntegro, membrana plasmática íntegra), TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico).