



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**EFEITO DA L-CARNITINA SOBRE A QUALIDADE DO
SÊMEN REFRIGERADO DE EQUINOS**

IGOR HENRIQUE DE AZEVEDO VALENÇA NERY

RECIFE – PE

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

EFEITO DA L-CARNITINA SOBRE A QUALIDADE DO
SÊMEN REFRIGERADO DE EQUINOS

IGOR HENRIQUE DE AZEVEDO VALENÇA NERY

Dissertação submetida à Coordenação do curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal Tropical.

RECIFE – PE

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Dissertação à disposição na Biblioteca Central da Universidade Federal Rural de Pernambuco. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas às normas de ética científica.

N456e Nery, Igor Henrique de Azevedo Valença
Efeito da l-carnitina sobre a qualidade do sêmen refrigerado de equinos / Igor Henrique de Azevedo Valença Nery. – Recife: 2016.
56 f. : il.

Orientadora: Maria Madalena Pessoa Guerra
Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina veterinária, Recife, 2016.
Referências.

1. Sêmen Refrigerado 2. Equino 3. L-Carnitina
I. Guerra, Maria Madalena Pessoa, orientadora II. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

EFEITO DA L-CARNITINA SOBRE A QUALIDADE DO SÊMEN
REFRIGERADO DE EQUINOS

IGOR HENRIQUE DE AZEVEDO VALENÇA NERY

Dissertação aprovada em 26 de fevereiro de 2016

Prof^a. Dr^a. Maria Madalena Pessoa Guerra / DMV-UFRPE

Orientadora

Prof. Dr. Claudio Coutinho Bartolomeu / DMV-UFRPE

Membro Titular

Prof^a. Dr^a. Karen Mascaro Gonçalves da Silva / IBGM

Membro Titular

Prof. Dr. Victor Netto Maia / UNINASSAU

Membro Suplente

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus pais, minha noiva, familiares e amigos.

“Nada resiste ao trabalho”

(Helder Melo)

AGRADECIMENTOS

Agradecer: mostrar-se grato; demonstrar, manifestar gratidão (AURÉLIO, 2004).

Desta forma, manifesto aqui toda a minha gratidão às pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Sou grato a todos os membros do ANDROLAB: Helder, Robespierre, Lucinha, Millena, Wilton, Bruna, Thalles e Aline.

Faço um agradecimento especial ao Dr. André Mariano Batista, primeiramente por ter me convidado a fazer parte desse tão seletivo grupo de pesquisadores, e por ter dedicado o seu tempo me auxiliando e orientando ao longo do mestrado.

Agradeço à Dr^a Girliane Regina, que tornou possível as dosagens L-carnitina e muito contribuiu para conclusão da pesquisa.

Sou grato aos que disponibilizaram os animais para o experimento, Dr. Osvaldo, Dr. Victor, Prof. Dr. Gustavo Ferrer e Sylvinho. Obrigado pelos Quarto de Milha.

Agradeço à minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Madalena Guerra, por ter me aceitado como orientado. Obrigado pela oportunidade e por todo o conhecimento que adquiri ao longo desses 2 anos.

Agradeço à minha noiva, Thábata Morales, pelo suporte emocional nos momentos difíceis e pela ajuda na formatação do trabalho. Amo-te.

Manifesto minha gratidão à FACEPE, pelo depósito sempre em dia da bolsa de estudos e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Não poderia deixar de agradecer também aos meus pais, meu irmão e minha prima Rosely, pois a família é a base de tudo.

APOIO FINANCEIRO

Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco – FACEPE.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Análise de correlação entre a concentração seminal de L- carnitina (LC) e a concentração espermática e a integridade de membrana plasmática e acrossomal de 14 garanhões Quarto de Milha.....	54
Figura 2. Média e Desvio Padrão da integridade das membranas plasmática e acrossomal (A), estabilidade de membrana (B) e concentração intracelular de ROS (C) de espermatozoides equinos submetidos à refrigeração por 72h na presença de diferentes concentrações de L-carnitina.....	55

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1. Correlação entre os níveis seminais de L-Carnitina e os níveis séricos de L-Carnitina, concentração espermática e integridade das membranas plasmática e acrossomal de garanhões Quarto de Milha.....	54
Tabela 2. Média e Desvio Padrão dos parâmetros cinéticos de espermatozoides equinos submetidos à refrigeração por 72h na presença de diferentes concentrações de L-carnitina.....	56

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

LC- L-carnitina

ALC- Acetil-L-carnitina

CoA- CoenzimaA

IA- Inseminação Artificial

CBRA- Colégio Brasileiro de Reprodução Animal

CASA- Sistema de Análise Espermática Computadorizada

PBS- Fosfato Salino Tamponado

iPAM- integridade das membranas plasmática e acrossomal

PNA-*Peanutaglutinin*

DMSO- Dimetilsulfóxido

IP- Iodeto de Propídio

YP- YO-PRO[®]-1 iodide

M540- merocianina 540

mV- milivolts

LIN - linearidade

MP- motilidade progressiva

MT – motilidade total

ROS – espécies reativas ao oxigênio

STR - retilinearidade

VAP – velocidade média da trajetória

VCL - velocidade curvilínea

VSL – velocidade em linha reta

RAP- Percentual de espermatozoides rápidos

ATP- adenosina trifosfato

DNA – ácido desoxirribonucleico

pH – potencial hidrogeniônico

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

Página

DEDICATÓRIA	
AGRADECIMENTOS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES	
RESUMO	
ABSTRACT	
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Refrigeração do sêmen equino.....	16
2.1.1 Diluidores.....	17
2.1.2 Temperaturas e Tempo de armazenamento.....	19
2.2 Estresse oxidativo	20
2.3 Metabolismo energético da célula espermática.....	22
2.4 L-Carnitina.....	23
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
4 ARTIGO.....	36
4.1 Efeitos da L-carnitina sobre a qualidade do sêmen refrigerado de equinos.....	36

RESUMO

A tecnologia de refrigeração do sêmen equino tem sido estudada pelo interesse na manutenção do potencial fertilizante dos espermatozoides. Durante o processo de refrigeração, particularmente no armazenamento do sêmen refrigerado por longos períodos, uma grande quantidade de células espermáticas perde sua capacidade fecundante. A L-carnitina (LC) desempenha papel fundamental no metabolismo espermático, pois fornece energia facilmente disponível por meio da β -oxidação, afetando positivamente a motilidade espermática. Baseado nisso, o objetivo deste trabalho foi investigar a correlação entre os níveis seminais e séricos de LC e a função espermática, e avaliar os efeitos da LC sobre a qualidade de espermatozoides equinos armazenados a 5 °C em diluidor à base de leite desnatado. Para tal, primeiramente foram utilizadas amostras de sêmen e sangue oriundas de 14 garanhões da raça Quarto de Milha, uma amostra de cada garanhão (n=14), onde o conteúdo de LC no plasma sanguíneo e no plasma seminal foi determinado por espectrofotometria. No segundo momento, quatro ejaculados de quatro garanhões da raça Quarto de Milha foram utilizados (n=16). Cada ejaculado foi dividido para formação dos grupos experimentais, os quais foram adicionados de LC: 0 (controle), 0,5, 1 e 2 mM. A motilidade espermática, a integridade da membrana plasmática e acrossomal, o conteúdo intracelular de ROS e a estabilidade da membrana plasmática foram avaliados imediatamente após atingir 5°C (0 h) e após, 24, 48 e 72 h. Houve correlação positiva entre L-carnitina no plasma seminal e ambas a concentração espermática ($r = 0,6055$) e a integridade das membranas plasmática e acrossomal ($r = 0,6971$), sugerindo um papel para L-carnitina como marcador da qualidade do sêmen de garanhões. Além disso, a adição de L-carnitina (1 e 2 mM) ao diluidor à base de leite desnatado preservou a manutenção da motilidade de espermatozoides equinos armazenados a 5 °C por 48 horas.

Palavras-chave: *Sêmen Refrigerado, Equino, L-Carnitina*

ABSTRACT

The equine sperm cooling technology has been studied in the interest of maintaining fertilizing potential of sperm over an extended period. During the cooling process, particularly in the refrigerated semen extended storage, a large portion of the sperm cells lose their fertilizing capacity. L-carnitine (LC) plays a key role in sperm metabolism, providing readily available energy through β -oxidation, which positively affect sperm motility. Based on this, the objective of this study was to investigate the association between serum and seminal LC and sperm function and evaluate the effect of LC on the quality of stallions semen stored at 5 °C in a Milk-based semen extender. To do this, first was used samples of semen and blood coming from 14 Quarter Horses stallions, where the LC content in blood plasma and seminal plasma was determined by spectrophotometry. In a second moment, ejaculated (n = 16) of four Quarter Horse stallions were used. Each ejaculate was split to formation of experimental groups which were added LC: 0 (control), 0.5, 1 and 2 mM. Sperm motility, integrity of plasmatic and acrosomal membranes, intracellular ROS content and stability of the plasmatic membrane were evaluated immediately after reaching 5 °C (0 h) and after 24, 48 and 72 h. There was a positive correlation between L-carnitine in seminal plasma and both sperm concentration and integrity of plasmatic and acrosomal membranes, suggesting a role for L-carnitine as a marker of semen quality of stallions. Furthermore, the addition of L-carnitine (1 and 2mM) in Milk-based semen extender preserved the maintenance of equine sperm motility stored at 5 °C.

Keywords: *Cooling semen, equine, L-Carnitine.*

1 INTRODUÇÃO

2

3 O Brasil possui hoje o terceiro maior rebanho de equinos do mundo, com cerca
4 de oito milhões de cabeças, rebanho este que exerce um papel de destaque na economia
5 do país. Alguns estudiosos estimam que haja uma movimentação econômica superior a
6 R\$ 7,3 bilhões anuais, gerando 640.000 empregos diretos e 3,2 milhões de empregos
7 indiretos (CNA, 2006).

8 A tecnologia de refrigeração do sêmen equino tem sido estudada pelo interesse
9 na manutenção do potencial fertilizante dos espermatozoides durante um período
10 prolongado (BATELLIER et al., 2001), oferecendo maior flexibilidade ao proprietário
11 do garanhão para colher e enviar o sêmen em momento oportuno (PICKETT, 1992).
12 Apesar dos avanços no uso de sêmen equino refrigerado, as taxas de prenhez após
13 inseminação artificial ainda são bastante variáveis (LISBOA et al., 2012).

14 Durante o processo de refrigeração, particularmente no armazenamento do
15 sêmen refrigerado por longos períodos, uma grande porção das células espermáticas
16 perde sua capacidade fecundante (STRADAIOLI et al., 2000). Acredita-se que este
17 fenômeno está diretamente ligado ao estresse oxidativo decorrente do desequilíbrio
18 entre a produção das espécies reativas de oxigênio (ROS) e dos antioxidantes,
19 consequência do aumento da produção dos oxidantes induzido pelo processo de
20 criopreservação (WATSON, 2000).

21 Os espermatozoides dos mamíferos são bastante susceptíveis ao estresse
22 oxidativo devido à grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados presentes na sua
23 membrana (ALVAREZ e STOREY, 1992), fator que a torna altamente sensível as ROS
24 (COMHAIRE et al., 1999), promovendo a peroxidação lipídica, ocasionando lesões na

25 membrana plasmática, acarretando em alterações na funcionalidade espermática (BALL
26 et al., 2002).

27 Vários estudos têm demonstrado efeitos benéficos da administração de
28 substâncias antioxidantes, por via oral ou pela adição ao meio de criopreservação de
29 sêmen, visando prevenir *in vitro* e *in vivo* os efeitos deletérios da produção elevada de
30 ROS, melhorando assim a qualidade espermática (PONS-REJRAJI et al., 2009).

31 A L-carnitina (LC) desempenha um papel fundamental no metabolismo
32 espermático fornecendo energia facilmente disponível por meio da β -oxidação
33 (MATALLIOTAKIS et al., 2000), o que afeta positivamente a motilidade espermática.
34 Este efeito benéfico é mediado pelo transporte de ácidos graxos de cadeia longa para
35 dentro da mitocôndria, o que auxilia também na redução da disponibilidade de lipídios
36 para a peroxidação (NEUMAN et al., 2002). A LC também desempenha um papel
37 antioxidante, resultado de um mecanismo de reparação pelo qual o excesso intracelular
38 da acetil-coenzima-A (acetil-CoA) é removido (AGARWAL, 2004).

39 Com base nestas características, numerosos experimentos têm sido realizados
40 buscando demonstrar o efeito benéfico da LC sobre a qualidade espermática. Resultados
41 demonstram que a adição de LC melhora a motilidade dos espermatozóides *in vitro*,
42 como também pode ter um efeito crioprotetor (AGARWAL, 2004).

43

44

45

46

47

48

49

50 2 REVISÃO DE LITERATURA

51 2.1 Refrigeração do sêmen equino

52 A inseminação artificial com sêmen refrigerado tem sido rotineiramente
53 utilizada na reprodução equina nos últimos 24 anos, uma vez que apresenta taxas de
54 fertilidade maiores, quando comparado com o sêmen congelado, ao ser utilizado até 24
55 horas após a colheita (PUGLIESE et al., 2012). Atualmente, a maioria das associações
56 de registro aprova o uso da inseminação artificial e a criação de cavalos tem se
57 beneficiado desta biotecnologia.

58 O uso do sêmen refrigerado transportado apresenta numerosas vantagens, como
59 redução dos custos e de estresses associados ao transporte e hospedagem dos animais,
60 diminuição dos riscos com acidentes e da aquisição de doenças resultantes da exposição
61 a patógenos de um novo ambiente, bem como permite a utilização de garanhões sem
62 interrupção de sua participação em atividades esportivas (BRINSKO e VARNER,
63 2000).

64 As taxas de prenhez quando utilizado sêmen equino refrigerado mostram grande
65 variação, podendo ser insatisfatória (HAADEM et al., 2015). O sucesso da refrigeração
66 dependerá da preservação dos espermatozóides durante período prolongado de tempo,
67 sem perda de sua capacidade fecundante (SILVA FILHO, 1998), estando este ponto
68 intimamente ligado a fatores como: ambiente espermático adequado (diluidor) e curva
69 de refrigeração, além da temperatura de manutenção que reduza o metabolismo
70 espermático e minimize os danos à membrana plasmática (LOOMIS, 1992).

71

72

73 2.1.1 Diluidores

74 A diluição é particularmente importante no armazenamento do sêmen equino
75 devido ao uso comercial do sêmen refrigerando nos programas de inseminação artificial
76 dessa espécie (HAYDEN et al., 2015). Os diluentes são soluções adicionadas ao sêmen
77 que favorecem uma maior longevidade à célula espermática durante os processos de
78 refrigeração e transporte, atuando na estabilização dos sistemas enzimáticos,
79 manutenção da integridade da membrana plasmática, nutrição da célula, proteção da
80 célula em casos de mudanças bruscas de temperatura, neutralização dos produtos
81 tóxicos produzidos pelos espermatozoides, prevenção do crescimento de
82 microrganismos, além de aumento de volume da amostra, devendo possuir
83 osmolaridade compatível com o sêmen (PICKETT e SHINER, 1994; BALL, 1998;
84 DARENIUS, 1998; SQUIRES et al., 1999; WEISS et al., 2003).

85 A escolha do diluente deve ser baseada no sistema de inseminação realizado,
86 tempo de estocagem, temperatura de estocagem e individualidade de resposta do
87 garanhão à refrigeração (PAGL et al., 2006).

88 De maneira geral, os diluentes podem ser divididos em quatro grupos: salinos, à
89 base de gema de ovo, à base de leite e derivados, e os que apresentam albumina sérica
90 bovina (AMANN e PICKETT, 1987; SILVA FILHO, 1994). Os diluentes utilizados
91 para preservação do sêmen equino refrigerado possuem, geralmente, leite e/ou gema de
92 ovo como um de seus componentes (HEITLAND et al., 1995). Sobreira Neto (2008)
93 testou um diluente à base de água de coco para refrigerar sêmen equino a 5°C, e obteve
94 resultados semelhantes ao diluidor à base de leite desnatado.

95 A gema de ovo tem como principal benefício a proteção que confere aos
96 espermatozoides contra o choque térmico. Acredita-se que esta proteção seja derivada

97 da presença de lipoproteínas de baixa densidade que permanecem firmemente ligadas
98 aos espermatozoides. Bergeron e Manjunath (2006) sugerem várias hipóteses para este
99 mecanismo de proteção, dentre elas citam a associação destas lipoproteínas à
100 membrana, estabilizando-a; a formação de uma película protetora de fosfolipídios na
101 superfície da membrana, reposição dos fosfolipídios da membrana e competição por
102 sítios de ligação na membrana com peptídeos deletérios presentes no plasma seminal.
103 Porém, apesar do fator proteção, a gema de ovo tem como desvantagem a formação de
104 lisolecitinas, derivadas da hidrólise de suas lecitinas, que causam desestabilização da
105 membrana; além da presença de progesterona, o que pode induzir a capacitação
106 espermática precoce, acarretando redução da fertilidade (LIPAR et al., 1999).

107 Assim como a gema de ovo, o leite também atua na proteção dos
108 espermatozoides, porém essa proteção parece não estar relacionada aos lipídios, mas às
109 proteínas e carboidratos, que, além de auxiliar no tamponamento fisiológico, também
110 promovem proteção celular. A caseína (proteína do leite) é apontada como responsável
111 por uma grande parcela desta proteção. No entanto, por se tratar de um fluido biológico
112 complexo, o leite pode apresentar tanto componentes benéficos quanto maléficos aos
113 espermatozoides, a exemplo das β -lactoglobulinas, que são benéficas, e das α -
114 lactoalbuminas, que são prejudiciais à sobrevivência dos espermatozoides (NUNES,
115 2006; SOBREIRA NETO, 2008).

116 Quando se busca melhorar a qualidade do sêmen, outras substâncias podem ser
117 adicionadas aos diluidores, a exemplo do acréscimo de antioxidantes que possibilitam
118 um aumento da longevidade do sêmen, atuando na preservação da motilidade e na
119 integridade da membrana espermática (BRUEMMERT et al., 2002; BALL, 2005).
120 Além disso, destaca-se a adição de antibióticos, visando minimizar o crescimento
121 bacteriano durante o armazenamento, potencializando a atividade protetora dos

122 diluentes no processo de refrigeração (AMMAN e PICKETT, 1987; DARENIUS,
123 1998).

124

125 *2.1.2 Temperatura e Tempo de Refrigeração do Sêmen Equino*

126 A preservação do sêmen por, pelo menos, 24 horas é importante para que o
127 mesmo seja transportado até o haras para a realização da inseminação artificial
128 (SQUIRES et al., 1999). Porém, armazenamento por longos períodos, superior a 24
129 horas, pode desencadear processos bioquímicos que comprometem a fertilidade dos
130 gametas, como a capacitação espermática prematura que resultará na diminuição da
131 capacidade de penetrar e fertilizar o oócito (POMMER et al., 2002).

132 Os espermatozoides são muito sensíveis às modificações que possam ocorrer
133 quando se refrigera o sêmen de 37 a 5 °C, isto é, na faixa em que devem sofrer
134 manipulações para conservação e transporte (MIES FILHO, 1987), verificando-se
135 choque térmico se a taxa de refrigeração não for controlada, principalmente entre 19 e 8
136 °C (MORAN et al., 1992). Nesta faixa de temperatura, ocorre a fase de transição dos
137 lipídeos da membrana, passando do estado fluido para o gel (STRYER, 1992), sendo
138 necessária a utilização de taxas de refrigeração lentas, não superiores a -0,05°C/min.
139 (AMANN e GRAHAM, 1993; SQUIRES et al., 1999).

140 Um sêmen acondicionado com taxas adequadas de refrigeração mantém a
141 capacidade fertilizante do espermatozoide durante o período de 24 a 48 horas, havendo
142 relatos de fertilidade normal de espermatozoides armazenados durante 71 a 96 horas
143 (BRINSKO e VARNER, 1992).

144 A temperatura final da curva de refrigeração também afeta os espermatozoides,
145 tendo efeito direto sobre as características de motilidade espermática, taxas de prenhez e
146 processos decorrentes do envelhecimento celular. Dela dependem processos
147 relacionados às lesões espermáticas causadas pelo frio, à taxa de crescimento
148 microbiano e ao estresse oxidativo das membranas (NUNES, 2006).

149 No entanto, não há consenso entre os pesquisadores em relação à temperatura
150 final de refrigeração do sêmen equino, uma vez que, segundo Province et al. (1985) e
151 Batellier et al. (2001), o sêmen armazenado na temperatura final de 20 a 15°C apresenta
152 valores superiores de motilidade espermática, quando comparado ao armazenado a 10
153 ou 5°C, por 24 e 36 horas de refrigeração. Enquanto Varner et al. (1988, 1989) relatam
154 que a estocagem entre 4 e 5°C, por 24 horas, resulta em maior motilidade espermática
155 do que entre 20 a 25°C. Corroborando esses últimos autores, Ball (1998) relata que
156 existe redução significativa da fertilidade quando o sêmen é estocado por 24 horas a
157 20°C, quando comparada àquela obtida após preservação a 5°C. Quanto ao efeito
158 temperatura de estocagem sobre a integridade da cromatina espermática, Love et al.
159 (2001) verificaram que temperaturas mais baixas como 5°C mostraram-se mais
160 eficientes, de 7 até 46 horas de armazenamento do sêmen, quando comparadas à
161 preservação a 20 °C.

162

163 **2.2 Estresse oxidativo**

164 A ocorrência do estresse oxidativo durante os processos de criopreservação do
165 sêmen afeta negativamente os parâmetros espermáticos e, eventualmente, conduz a uma
166 diminuição do seu potencial reprodutivo (SOBHANI et al., 2015).

167 O estresse oxidativo ocorre quando há desequilíbrio entre a produção e a
168 eliminação de ROS, moléculas e radicais livres altamente reativos que possuem um
169 elétron desemparelhado (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989) e induzem danos aos
170 espermatozoides dos mamíferos (ALVAREZ et al., 1987).

171 Uma grande parte das células espermáticas perde sua capacidade fecundante
172 durante o processo de refrigeração do sêmen, sendo este fenômeno relacionado com o
173 estresse oxidativo, devido ao aumento da produção de ROS durante o processo de
174 refrigeração (WATSON, 2000).

175 Os espermatozoides equinos, como os de outros mamíferos, são bastante
176 susceptíveis ao estresse oxidativo devido à grande quantidade de ácidos graxos
177 poliinsaturados presentes em sua membrana (ALVAREZ e STOREY, 1992), fator que a
178 torna altamente sensível às ROS (COMHAIRE et al., 1999), promovendo a peroxidação
179 lipídica, ocasionando lesões na membrana plasmática, além de causar danos ao
180 acrossoma e ao potencial de membrana mitocondrial (BAUMBER et al., 2000),
181 acarretando alterações na funcionalidade espermática (BALL et al., 2002).
182 Concentrações elevadas de ROS causam redução do metabolismo energético, da
183 motilidade e da viabilidade espermática (ARMSTRONG et al., 1999; BAUMBER et al.,
184 2002; BILODEAU et al., 2002).

185 Fisiologicamente, as ROS desempenham papel importante na capacidade
186 fecundante dos espermatozoides, atuando nos processos de hiperativação da motilidade,
187 capacitação espermática e reação acrossômica (AITKEN, 1995), sendo produzidos
188 durante a respiração mitocondrial (AL-ABDULLA e LEE, 1998), tendo como resultado
189 do metabolismo celular o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, as principais
190 ROS observadas no sêmen (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

191 Assim, a manutenção das funções espermáticas fisiológicas depende da
192 produção controlada de ROS. Em contrapartida, a superprodução de ROS ou falha na
193 defesa antioxidante causam o estresse oxidativo ao espermatozoide, resultando em baixa
194 fertilidade (AITKEN, 1995).

195

196 **2.3 Metabolismo energético da célula espermática**

197 O espermatozoide requer um fornecimento adequado e crescente de ATP para a
198 manutenção de sua motilidade, bem como para promover sua capacitação e
199 hiperativação, eventos essenciais à fecundação. Os espermatozoides dos mamíferos
200 podem produzir energia através da glicólise anaeróbica, por oxidação dos produtos
201 metabólicos da glicólise ou pela oxidação de substratos endógenos (PASUPULETI,
202 2007).

203 Pequena (10%) produção de ATP do espermatozoide é proveniente do
204 metabolismo de componentes endógenos, como os fosfolipídios oxidados pelas
205 mitocôndrias, enquanto a maior produção (90%) resulta do metabolismo de substratos
206 exógenos (AMANN e GRAHAM, 2011).

207 Glucose, frutose e manose são exemplos de açúcares simples que o
208 espermatozoide tem a capacidade de metabolizar, além do glicerol, lactato, piruvato e
209 acetato, utilizando-os em via glicolítica para produção de energia (FRENKEL, 1973).

210 A peça intermediária do espermatozoide contém mitocôndrias estrategicamente
211 localizadas, onde podem alimentar eficientemente o batimento flagelar, sendo a
212 oxidação mitocondrial mais eficiente que a glicólise para a produção de ATP
213 (STOREY, 1975).

214 Gibb et al. (2012) relataram que os espermatozoides de garanhões são
215 predominantemente dependentes da fosforilação oxidativa para a produção de ATP,
216 sendo esse fato, aparentemente, responsável pelas altas taxas de estresse oxidativo dos
217 espermatozoides equinos e da alta velocidade destes espermatozoides, quando
218 comparados aos espermatozoides humanos.

219 A β -oxidação é a via catabólica de degradação de ácidos graxos para produção
220 de energia que ocorre na matriz mitocondrial, após a ativação e entrada de ácidos graxos
221 na mitocôndria. A β -oxidação é dividida em três fases: ativação do ácido graxo, β -
222 oxidação propriamente dita e respiração celular (MURRAY et al., 1994).

223 A ativação dos ácidos graxos consiste na entrada destes na mitocôndria na forma
224 de Acil-CoA, dependente da ligação do ácido graxo com a coenzima A, formando o
225 Acil-CoA no citosol, sendo a reação catalizada pela enzima Acil-Coa Sintetase,
226 localizada na membrana mitocondrial externa. A LC tem o papel de mediar o transporte
227 do radical acila através da membrana mitocondrial interna, carregando do citosol para a
228 matriz mitocondrial, sendo a transferência do radical acila da CoA para a LC, catalizada
229 pela enzima carnitina –Acil-Transferase I. Na matriz mitocondrial, a carnitina doa
230 novamente o radical acila para a CoA, regenerando o Acil-CoA no interior da
231 mitocôndria. Os radicais acetil dos Acetil-CoAs são oxidados no ciclo de Krebs,
232 sintetizando ATP (VILLELA et al., 1976; WANNMACHER, 1988).

233

234 **2.4 L-Carnitina**

235 L-carnitina é uma amina quaternária, altamente polar e solúvel em água, que é
236 amplamente distribuída na natureza (BIEBER, 1988). É um poderoso antioxidante e

237 essencial para função mitocondrial e regulação da produção de ATP (GIBB et al.,
238 2014).

239 As maiores concentrações de LC nos mamíferos são encontradas no trato genital
240 masculino, mais especificamente no tecido epididimal, no plasma seminal e nos
241 espermatozoides. O epidídimo possui um mecanismo de concentração para LC, sendo
242 de 10 a 50 vezes maior do que no plasma sanguíneo (BOHMER et al.,1978). A
243 testosterona aparenta ser responsável por essa concentração elevada de LC epididimal.
244 Brooks et al. (1974) trataram ratos castrados com testosterona e observaram aumento
245 das concentrações de LC no epidídimo desses animais. Segundo esses autores, ratos
246 criptorquídeos adultos apresentaram concentrações epididimárias menores de LC.

247 Um sistema de transporte ativo é responsável por deslocar a LC livre do plasma
248 sanguíneo para o lúmen do epidídimo (YEUNG et al., 1980). Cátion transportador
249 orgânico OCTN2 é o responsável por transportar a LC para as células do epitélio do
250 epidídimo (RODRIGUEZ et al., 2002).

251 A LC possui papel essencial na maturação dos espermatozoides. A maturação
252 pós-gonadal dos espermatozoides ocorre principalmente na cabeça do epidídimo, onde o
253 espermatozoide entra em contato com quantidade significativa de LC, local onde eles
254 adquirem a capacidade de promoverem a motilidade progressiva. Desta forma, fica
255 claro que há uma relação entre a concentração elevada de LC no lúmen epididimal e o
256 ganho da capacidade de motilidade progressiva dos espermatozoides (JEULIN et al.,
257 1987). Foi relatado também que essa concentração elevada de LC no fluido epididimal
258 tem o papel de manter os espermatozoides num estado quiescente (DEANA et al.,
259 1989), além de afetar a maturação espermiática testicular indiretamente, através da
260 estimulação das células de Sertoli, resultado do aumento da secreção de piruvato e

261 lactado, que servem de substrato energético para a maturação das células germinativas
262 (PALMERO et al., 2000).

263 O espaço no interior da matriz mitocondrial, que aloja um sistema de enzimas
264 responsáveis pela oxidação de ácidos graxos, é o principal alvo da LC, onde a mesma
265 desempenha papel fundamental na β -Oxidação mitocondrial de ácidos graxos de cadeias
266 longas (JEULIN e LEWIN, 1996). A LC regula o balanço energético, interferindo no
267 fluxo de grupos acila através das membranas celulares. Durante sua passagem pelas
268 membranas celulares, os grupos acila são temporariamente transferidos para a LC,
269 produzindo Acetil-L-Carnitina (ALC). Desta forma, facilitando o transporte dos grupos
270 acila, modulando as concentrações mitocondriais de CoA, implicando nas vias
271 metabólicas (ciclo de Krebs), na β -Oxidação de ácidos orgânicos e na degradação
272 oxidativa de aminoácidos (BAHL e BRESLER, 1987).

273 por Stradaoli et al. (2000), os quais relataram haver correlação positiva entre os níveis
274 de L-carnitina no plasma seminal com a concentração espermática de garanhões da raça
275 Maremmano.

276 A LC apresenta também papel antioxidante, uma vez que diminui a
277 disponibilidade de fosfolipídios para a peroxidação lipídica, assim como indiretamente é
278 capaz de auxiliar a atividade de antioxidantes proteicos, a superóxido dismutase e a
279 glutathione peroxidase (NEUMAM, 2002), além de ser responsável pela remoção de
280 excesso intracelular tóxico acetil-CoA, que protege os espermatozoides dos danos
281 oxidativos (VICARI e CALOGERO, 2001)

282

283

284 **3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

285 AITKEN, R.J. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction,**
286 **Fertility and Development**, v. 7, p. 659- 68, 1995.

287 AL-ABDULLA, A.N.; LEE, J.M. Apoptosis of retrogradely degenerating neurons
288 occurs in association with the accumulation of perikaryal mitochondria and oxidative
289 damage to the nucleus. **American Journal of Physiology**, v. 153, p. 447-456, 1998.

290 ALVAREZ, J.G.; TOUCHSTONE, J.C.; BLASCO, L.;STOREY, B.T. Spontaneous
291 lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human
292 spermatozoa Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity.
293 **Journal of Andrology**, v. 8, p. 338-348, 1987.

294 ALVAREZ, J.G.; STOREY, B.T. Evidence for increased lipid peroxidative damage
295 and loss of superoxide dismutase activity as a model of sublethal cryodamage to human
296 sperm during cryopreservation. **Journal of Andrology**, v. 23, p. 232-241, 1992.

297 AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of
298 cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal Equine Veterinary Science**, v. 7, n.
299 3, p. 145-173, 1987.

300 AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: McKINNON, A.O., VOSS,
301 J.L. **Equine reproduction**, 1ed. Philadelphia: Lea &Febiger, 1993. cap.80, p.715-745.

302 AMANN, R.P.; GRAHAM, J.K. Spermatozoal function. In: McKINNON, A.O.,
303 SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. **Equine reproduction**. West Sussex:
304 Wiley-Blackwell, p.1053-1084. 2011.

305 AGARWAL, A. Carnitines and Male Infertility, **Reproductive Biomedicine**, v. 8. n. 4,
306 p. 376-384, 2004.

307 ARMSTRONG, J.S.; RAJASEKARAN, M.; CHAMULITRAT, W.;GATTI,
308 P.;HELLSTROM, W.J.;SIKKA, S.C. Characterization of reactive oxygen species
309 induced effects on human spermatozoa movement and energy metabolism. **Free**
310 **Radical Biology & Medicine**, v. 26, p.869-880, 1999.

311 BAHL, J.; BRESLER, R. The pharmacology of carnitine. **Annual Review of**
312 **Pharmacology and Toxicology**,v. 27, p. 257–277, 1987.

313 BALL, B.A.; VO, A.T. Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based
314 upon lipophilic fluorescent de C11-BODIPY581/591. **Journal of Andrology**, v. 23, p.
315 259-269, 2002.

316 BALL, B.A. Evaluation and use of transported equine semen. In: EQUINE ASSISTED
317 REPRODUCTIVE TECHNOLOGY WORKSHOP, 1998, Davis. **Proceedings...**Davis,
318 1998.

319 BALL, B.B.; VO, A.T. Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based
320 upon the lipophilic fluorescent dye C11-BODIPY581/591.**Journal of Andrology**, v. 23,
321 p. 259-269, 2002.

322 BALL, B.A. Hysteroscopic and low-dose insemination techniques.In: CONGRESSO
323 NAZIONALE MULTISALA SIVE, 11, 2005, Pisa. **Proceedings...**Pisa, 2005. 3p.

324 BAUMBER, J.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G; MEDINA, V.; DAVIES-MOREL,
325 M.C. The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability,
326 acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid
327 peroxidation. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 895-902, 2000.

328 BAUMBER, J.; VO, A.; SABEUR, K; BALL, B.A. Generation of reactive oxygen
329 species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa.
330 **Theriogenology**, v. 57, p.1025-1033, 2002.

331 BATELLIER, F.; VIDAMENT, M.; FAUQUANT, J.; DUCHAMP, G. ARNAUD, G.;
332 YVON, J.M.; MAGISTRINI, M. Advances in cooled semen technology.
333 **Animal Reproduction Science**, v.68, n.3-4, p.181-190, 2001.

334 BILODEAU, J.F.; BLANCHETTE, S.; CORMIER, N.; SIRAD M.A. Reactive oxygen
335 species-mediated loss of bovine sperm motility in egg yolk Tris extender: protection by
336 pyruvate, metal chelators and bovine liver or oviductal fluid catalase. **Theriogenology**,
337 v.57, p.1105-1122, 2002.

338 BIEBER, L. Carnitine. **Annual Review of Biochemistr**, v.57, p. 261–283, 1988.

339 BOHMER, T.; HOEL, P.; PURVIS, K.; HANSSON, V. Carnitine levels in human
340 accessory sex organs.**Archives of Andrology**,v.1, p. 53–59, 1978.

341 BRINSKO, S.P.; VARNER, D.D. Artificial Insemination. In: McKINNON, A.O.;
342 VOSS, J.L. (Eds.). **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea &Febiger, 1992. p.790-
343 797.

344 BRINSKO, S.P.; VARNER, D.D. Artificial Insemination. In: McKINNON, A.O.;
345 VOSS, J.L. (Eds.). **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea &Febiger, 1992. p.790-
346 797.

347 BRINSKO, S.P.; CROCKETT, E.C.; SQUIRES, E.L. Effect of centrifugation and
348 partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and
349 storage.**Theriogenology**, v.54, p.129-136, 2000.

350 BROOKS, D.; HAMILTON, D.; MALLEK, A. Carnitine and
351 glycerylphosphorylcholine in the reproductive tract of the male rat. **Journal of**
352 **Reproduction and Fertility**, v. 36, p. 141–160, 1974.

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

356 CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL – CNA.
357 **Estudo do complexo do agronegócio do cavalo no Brasil**. Brasília: CNA, 2006.

358 COMHAIRE, F.H.; MAHMOUD, A.M.A; DEPUYDT, C.E.; ZALATA, A.A.;
359 CHRISTOPHE, A.B. Mechanisms and effects of male genital tract infection on sperm
360 quality and fertilizing potential: the andrologist’s viewpoint. **Human Reproduction**
361 **Update**, v. 5, n. 5, p. 393-398, 1999.

362 DARENIUS, A. Experiences with chilled, transported equine semen. In: STALLION
363 REPRODUCTION SYMPOSIUM, 1998, Society for Theriogenology - American
364 Association of Equine Practitioners. **Proceedings...**1998, p.60-70.

365 DEANA, R.; RIGONI, F.; FRANCESCONI, M.; CAVALLINI, L.; ARSLAN
366 P.; SILIPRANDI, N. Effect of L-carnitine and L-aminocarnitine on calcium transport,
367 motility and enzyme release from ejaculated bovine spermatozoa. **Biology of**
368 **Reproduction**,v.41, p. 949–955, 1989.

369 FRENKEL, G.; PETERSON, R.N.; FREUND, M. Changes in the metabolism of guinea
370 pig sperm from different segments of the epididymis.**Proceedings of The Society for**
371 **Experimental Biology and Medicine**, v. 143, n. 4, p. 1231-6, 1973.

372 GIBB, Z.; LAMBOURNE, S.R.; AITKEN, R.J. Oxidative phosphorylation is essential
373 for stallion sperm motility (Abstract). In: **Annual Conference of the Society for**
374 **Reproductive Biology**, 43, Gold Coast, Australia, 2012.

375 GIBB, Z.; LAMBOURNE, S.R.; AITKEN, R.J. Pyruvate and L-carnitine are pro-
376 survival factors for stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 34,
377 p. 31, 2014.

378 HAADEM, C.S.; NØDTVEDT, A.; FARSTAD, W.; THOMASSEN, R. A
379 retrospective cohort study on fertility in the Norwegian Coldblooded trotter after
380 artificial insemination with cooled, shipped versus fresh extended semen.
381 **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 14, p. 57-77, 2015.

382 HALLIWELL B.; GUTTERIDGE J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**,
383 2ed. Oxford: University Press, p. 543, 1989.

384 HEITLAND, A.V., JASKO, D.J., GRAHAM, J.K., SQUIRES, E.L., AMANN, R.P.,
385 PICKETT, B.W. Motility and fertility of stallion spermatozoa cooled and frozen in a
386 modifiedskim milk extender containing egg yolk and liposome. **Biology of**
387 **Reproduction**, v.1, p.753-759, 1995.

388 JEULIN, C.; SOUFIR, J.; MARSON, J.; PAQUIGNON, M.; DACHEUX, J.L. The
389 distribution of carnitine and acetylcarnitine in the epididymis and epididymal
390 spermatozoa of the boar. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.79, p. 523–529.
391 1987.

392 JEULIN, C.; LEWIN, L. Role of free L-carnitine and acetyl-Lcarnitine in post-gonadal
393 maturation of mammalian spermatozoa. **Human Reproduction Update**, v.2, p. 87–102,
394 1996.

395 LIPAR, J.L.; KETTERSON, E.D.; NOLAN, V.J.R.; CASTRO, J.M. Egg yolk, layers
396 vary in the concentration of steroid hormones in two avian species. **Genetic**
397 **Compendium of Endocrinology**, v.115, p. 220-227, 1999.

398 LISBOA, F.L.; HARTIWIG, F.P.; MAZIERO, R.R.D.; MONTEIRO, G.A.; PAPA,
399 F.O.; DELL'AQUA JR, J.A. Use of L-carnitine and acetyl-L-carnitine in cooled-stored
400 stallion semen. **Journal of Equine Veterinary**, v.32, p.475-518, 2012.

401 LOOMIS, P. R. Factors affecting the success of artificial insemination with cooled,
402 transported semen. In: ANNUAL CONVENTION OF AMERICAN ASSOCIATION
403 OF EQUINE PRACTITIONERS, 38., 1992, **Proceedings**... Orlando: AAEP, p. 629-647,
404 1992.

405 LOVE, C.C.; THOMPSON, J.A.; LOWRY, V.K.; VARNER, D.D. The relationship
406 between chromatin quality and fertility of chilled stallion sperm. In: AMERICAN
407 ASSOCIATION EQUINE PRACTITIONERS, 47, 2001, San Diego.
408 **Proceedings**...San Diego, v.47, 2001.

409 MATAILLIOTAKIS, I.; YOUMANTAKI, Y.; EVAGELIOU, A. L-Carnitine levels in
410 the seminal plasma of fertile and infertile men: correlation with sperm quality.
411 **International Journal of Fertility**, v.45, p. 236–240, 2000.

412 MURRAY, R.K; GRANNER, D.K; MAYES, P.A; RODWELL, V.W; HARPER:
413 **Bioquímica**. 7 ed. São Paulo: Atheneu, 1994.

414 MIES FILHO, A. **Reprodução dos Animais Domésticos**. Sulina: Porto Alegre, 6ª
415 edição, volume II, 1987, 783 p.

416 MORAN, D.M.; JASKO, D.J.; SQUIRES, E.L.; AMANN, R.P. Determination of

417 temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa.
418 **Theriogenology**. v.38, n.6, p.999-1012, 1992.

419 NUNES, D.B. *Container(CP) para refrigeração e preservação do sêmen*
420 *equino*.**Dissertação (Mestrado)** –Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. 70p,
421 2006.

422 NEUMAN, S.L.; LIN, T.L.; HESTE, P.Y. The effect of dietary carnitina on semen traits
423 of white Leghorn roosters. **Poultry Science**, v.81, n.4, p.495-503, 2002.

424 PAGL, R.; AURICH, J.E.; MULLER-SCHLOSSER, F.; KANKOFER, M.; AURICH,
425 C. Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim
426 milk-based extender for storage of equine semen at 5 °C. **Theriogenology**, v.66,
427 p.1115-1122, 2006.

428 PASUPULETI, V. Role of glycolysis and respiration in sperm metabolism and motility.
429 **Dissertação (Mestrado)** –Kent State University, 2007

430 PALMERO, S.; BOTTAZZI, C.; COSTA, M.; LEONE, M.; FUGASSA, E. Metabolic
431 effects of L-carnitine on prepubertal rat Sertoli cells. **Hormone and Metabolic**
432 **Research**, v.32, p. 87–90, 2000.

433 PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. Cryopreservation of semen. In: McKINNON, A.O.;
434 VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea &Febiger, 1992. Cap. 83, p. 769-
435 789

436 PICKETT, B.W., SHINER, K.A. Recent developments in artificial insemination in
437 horses. **Livestock Production Science**, v.40, n.1, p.31-36, 1994.

438 POMMER, A.C., LINFOR, J.J., MEYERS, S.A. Capacitation and acrosomal exocytosis
439 are enhanced by incubation of stallion spermatozoa in a commercial semen extender.
440 **Theriogenology**, v.57, n.5, p.1493-1501, 2002.

441 PONS-REJRAJI, H.; SION, B.; SAEZ, F.; BRUGNON, F.; JANNY, L.; GRIZARD, G.
442 Role of reactive oxygen species (ROS) on human spermatozoa and male infertility.
443 **Gynecology, Obstetrics and Fertility**, v. 28, p. 203 – 213, 2009.

444 PROVINCE, C.A., SQUIRES, E.L., PICKETT, B.W., AMANN, R.P. Cooling rates,
445 storage temperatures and fertility of extended equine spermatozoa.
446 **Theriogenology**.v.23, n.6, p.925- 934, 1985.

447 PUGLIESI, G.; CARVALHO, G.R.; RATES, D.M.; KER, P.G.; MATTA, M.P.;
448 OLIVEIRA, R. R.; SILVA FILHO, J. M. Viability and fertility of cooled equine semen
449 diluted with skimmed milk or glycine egg yolk-based extenders. **Revista Brasileira de**
450 **Zootecnia**, v. 41, n.12,2012.

451 RODRIGUEZ, C.; LABUS, J.; HINTON, B. Organic cation/carnitine transporter,
452 OCTN2, is differentially expressed in the adult rat epididymis. **Biology of**
453 **Reproduction**, v. 67, p. 314–319, 2002.

454 HAYDEN, S.S.; BLANCHARD, T.L.; BRINSKO, S.P., VARNER, D.D.; HINRICHS,
455 K.; LOVE, C.C.The “dilutioneffect” in stallionsperm. **Theriogenology**, v. 83, p. 772–
456 777, 2015.

457 SILVA FILHO, J.M., PALHARES, M.S., FONSECA, F.A. Transporte e inseminação
458 artificial com sêmen de equino. **Caderno Técnico da Escola de Veterinária da**
459 **UFMG**, Belo Horizonte, n.11, p.3-112, 1994.

460 SILVA FILHO, J.M.; FONSECA, F.A.;PALHARES, M.S.; WANDERLEY, A.T.
461 Avaliação de uma técnica de diluição e de transporte de sêmen eqüino, para as
462 condições brasileiras. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 27, n. 1, p. 66-74, 1998.

463 SOBREIRA NETO, J.A. Avaliação in vitro e in vivo do sêmen equino diluído em água
464 de coco em pó (ACP105) e refrigerada a 5°C. **Dissertação (Mestrado)** –Faculdade de
465 Adronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília. 60 p. 2008.

466 SOBHANI, A.; EFTEKHAARI, T.E.; SHAHRZAD, M.E.; NATAMI, M.; FALLAHI,
467 S. Antioxidant Effects of Brown Algae Sargassum on Sperm Parameters: CONSORT-
468 Compliant Article. **Medicine**, v. 94, p. 52,2015.

469 SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, J.K.; VANDERWALL, D.K.; MCCUE,
470 P.M.; BRUEMMER, J.E. Cooled and Frozen Stallion Semen. **Animal Reproduction**
471 **and Biotechnology Laboratory**,Bulletin No 9, p.1-38, 1999.

472 STOREY, B.T.; KAYNE, F.J. Energy metabolism of spermatozoa. V. The Embden-
473 Myerhof pathway of glycolysis: activities of pathway enzymes in hypotonically treated
474 rabbit epididymal spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v.26, n. 12, p. 1257-65, 1975.

475 STRADAIOLI, G.; SYLLA, L.; ZELLI, Rl. Seminal carnitine and acetylcarnitine
476 content and carnitina acetyltransferase activity in young Maremmno stallions. **Animal**
477 **Reproduction Science**, v.64, p.233-45, 2000.

478 STRYER, L. Introdução ao estudo das membranas biológicas. In:____. **Bioquímica**. 3.
479 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. cap. 12, p. 230-256.

480 VARNER, D.D., BLANCHARD, T.L., LOVE, C.L., GARCIA, M.C., KENNEY, R.M.

481 Effects of cooling rate and storage temperature on equine spermatozoa motility
482 parameters. **Theriogenology**, v.29, p.1043-1053, 1988.

483 VARNER, D.D., BLANCHARD, T.L., MEYERS, P.J., MEYERS, S.A. Fertilizing
484 capacity of equine spermatozoa stored for 24 hours at 5 or 20°C. **Theriogenology**, v.32,
485 n.4, p.515- 525, 1989.

486 VILLELA, G.G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. **Bioquímica**. 3ed. Rio de Janeiro:
487 Guanabara Koogan, 1976.

488 VICARIE, E.; CALOGERO, A. Effects of treatment with carnitines in infertile patients
489 with prostatitis-epididymitis. **Human Reproduction**, v.16, p. 2338–2342, 2001.

490 WANNMACHER, C.M.D.; DIAS, R.D. **Bioquímica fundamental**. 6 ed. Porto Alegre:
491 UFRGS, 1988.

492 WATSON, P.F. The causes of reduced fertility of cryopreserved semen. **Animal**
493 **Reproduction Science**, v. 60-61, n. 2, p. 481-492, 2000.

494 WEISS, R.R.; VIANNA, B.C.; MURADÁS, P.R. Inseminação artificial em éguas com
495 sêmen “*in natura*” e diluído. **Archives of Veterinary Science**, v. 8, n. 1, p. 19-22,
496 2003.

497 YEUNG, C.; COOPER, T.; WAITES, G. Carnitine transport into the perfused
498 epididymis of the rat: regional differences, stereospecificity, stimulation by choline, and
499 the effect of other luminal factors. **Biology of Reproduction**, v. 23, p. 294–304, 1980.

500

501

502

503 **4 ARTIGO**

504 **4.1 Efeitos da L-carnitina sobre a qualidade do sêmen refrigerado de equinos**

505 *Effects of L-carnitine on equine semen quality during liquid-storage*

506
507 I.H.AV.Nery^a, R.A.J.AraújoSilva^a, H.M.Souza^a, L.C.P. Arruda^a, M.M.Monteiro^a, G.R.
508 Silva^b, G.F. Carneiro^c, A.M. Batista^a, M.M.P. Guerra^a

509
510 ^a *Laboratório de Andrologia (ANDROLAB), Departamento de Medicina Veterinária,*
511 *Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 Recife, Pernambuco, Brasil*

512 ^b *Laboratório de Bioprospecção Fitoquímica (BIOFITO), Departamento de Ciências*
513 *Moleculares, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900 Recife,*
514 *Pernambuco, Brasil*

515 ^c *Laboratório de Reprodução Animal, Unidade Acadêmica de Garanhuns, Universidade*
516 *Federal Rural de Pernambuco, 55292-270 Garanhuns, Pernambuco, Brasil*

517
518
519
520
521
522
523
524 ***Autor para correspondência:** Maria Madalena Pessoa Guerra, Departamento de
525 Medicina Veterinária – UFRPE, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos,
526 Recife, PE. CEP: 52171-900, Brasil. Tel: +55 81 3320 6412, Fax: 3320 6057. E-mail:
527 mmpguerra@pq.cnpq.br e mpguerra@dmv.ufrpe.br

528 **Resumo**

529 A L-carnitina (LC) desempenha papel fundamental no metabolismo espermático, pois
530 fornece energia facilmente disponível por meio da β -oxidação, afetando positivamente a
531 motilidade espermática. Baseado nisso, o objetivo deste estudo foi investigar a
532 correlação entre os níveis seminais e séricos de LC e a função espermática, bem como
533 avaliar os efeitos da LC sobre a qualidade do sêmen equino armazenado a 5 °C em
534 diluidor à base de leite desnatado. Para tal, primeiramente foram utilizadas amostras de
535 sêmen e sangue oriundas de 14 garanhões da raça Quarto de Milha, onde o conteúdo de
536 LC no plasma sanguíneo e no plasma seminal foi determinado por espectrofotometria.
537 No segundo momento, ejaculados (n=16) de quatro garanhões da raça Quarto de Milha
538 foram utilizados. Cada ejaculado foi dividido para formação dos grupos experimentais,
539 aos quais foram adicionados de LC nas seguintes concentrações: 0 (controle), 0,5, 1 e 2
540 mM. A motilidade espermática, a integridade da membrana plasmática e acrossomal, o
541 conteúdo intracelular de ROS e a estabilidade da membrana plasmática foram avaliados
542 imediatamente após atingir 5°C (0 h) e após, 24, 48 e 72 h. Houve correlação positiva
543 entre os níveis de L-carnitina no plasma seminal com a concentração espermática e a
544 integridade das membranas plasmática e acrossomal. Além disso, a adição de L-
545 carnitina (1e 2mM) ao diluidor à base de leite desnatado, preservou a motilidade de
546 espermatozoides equinos armazenados a 5 °C.

547 **Palavras-chave:** *Antioxidante, sêmen refrigerado, citometria de fluxo, plasma seminal.*

548

549 **Abstract**

550 L-carnitine (LC) plays a key role in sperm metabolism, providing easily
551 available energy through β -oxidation, which positively affect sperm motility. Based on
552 this, the objective of this study was to investigate the association between serum and
553 seminal LC levels and sperm function and evaluate the effect of LC on the quality of
554 stallions semen stored at 5 °C in a milk-based semen extender. To do this, first it was
555 used samples of semen and blood coming from 14 Quarter Horses stallions, where the
556 LC content in blood plasma and seminal plasma was determined by spectrophotometry.
557 In a second moment, ejaculates (n = 16) from four Quarter Horse stallions were used.
558 Each ejaculate was split to form experimental groups to which were added LC in the
559 following concentrations: 0 (control), 0.5, 1 and 2mM. Sperm motility, integrity of
560 plasmatic and acrosomal membranes, intracellular ROS content and stability of the
561 plasmatic membrane were evaluated immediately after reaching 5 °C (0 h) and after 24,
562 48 and 72 h. There was a positive correlation between L-carnitine levels in seminal
563 plasma with sperm concentration and integrity of plasmatic and acrosomal membranes.
564 Furthermore, the L-carnitine (1 and 2mM) addition in milk-based semen extender
565 preserves the motility of equine sperm stored at 5 °C.

566 **Keywords:** *Antioxidant, cooled semen, flow cytometry, seminal plasma.*

567

568

569

570 **1. Introdução**

571 A inseminação artificial (IA) com sêmen refrigerado é a biotécnica reprodutiva
572 mais utilizada na equinocultura (Lindahl et al., 2012), porém, a tolerância dos
573 espermatozoides ao processo de refrigeração varia significativamente entre os
574 gananhões (Brinsko et al., 2000). O sêmen de muitos gananhões é incapaz de manter a
575 motilidade espermática aceitável depois de submetido à baixa temperatura de
576 refrigeração (Lommis, 2001), possivelmente devido à variabilidade individual na
577 composição do plasma seminal (Aurich et al., 1996). Desta forma, as taxas de prenhez
578 após IA com sêmen refrigerado de equinos pode apresentar resultados distintos
579 (Haadem et al., 2015).

580 As causas exatas da diminuição da motilidade espermática nos processos de
581 criopreservação do sêmen ainda são desconhecidas, sendo provavelmente multifatoriais
582 (Grizard et al., 1992; Agarwal, 2004). Este fenômeno pode ser atribuído a dois fatores
583 gerados durante o processo de criopreservação: estresse oxidativo decorrente do
584 desequilíbrio entre as concentrações de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de
585 antioxidantes no sêmen (Watson, 2000), e variação nos níveis seminais de L-carnitina
586 (Grizard et al., 1992; Agarwal, 2004).

587 A L-carnitina desempenha papel fundamental no metabolismo espermático,
588 fornecendo energia facilmente disponível por meio da β -oxidação (Matalliotakis et al.,
589 2000), o que afeta positivamente a motilidade espermática. Este efeito benéfico é
590 mediado pelo transporte de ácidos graxos de cadeia longa para dentro das mitocôndrias,
591 o que auxilia também na redução da disponibilidade de lipídios para a peroxidação,
592 exercendo papel de antioxidante (Neuman et al., 2002), além de atuar como osmólito
593 (Gibb et al., 2015). Estas características sugerem que esta molécula seja de extrema
594 importância na fertilidade.

595 Tem sido demonstrado que a suplementação da dieta com L-carnitina melhora a
596 motilidade progressiva de espermatozoides de garanhões oligoastenospermicos ao longo
597 do tempo (Stradaioli et al., 2004). Ressalta-se, ainda, que a adição de L-carnitina
598 adicionada diretamente ao meio de diluição de sêmen melhora os parâmetros seminais
599 de homens (Banihani et al.,2014;Zhang et al., 2015), coelhos (El-Nattat et al., 2011;
600 Sariozkan et al., 2014), gatos (Manne-In et al., 2014) e ratos (Aliabadi et al., 2013).
601 Entretanto, os estudos investigando o efeito da suplementação *in vitro* com L-carnitina
602 sobre espermatozoides refrigerados de equinos são limitados (Lisboa et al., 2012, 2014).

603 Diante do exposto, os objetivos deste estudo foram: investigar os efeitos dos
604 níveis seminais e séricos de L-carnitina sobre a função espermática, e avaliar os efeitos
605 da L-carnitina sobre a qualidade do sêmen de garanhões, armazenado a 5 °C em diluidor
606 à base de leite desnatado.

607

608 **2. Materiais e Métodos**

609 Todos os procedimentos envolvendo animais foram realizados após aprovação
610 pela Comissão de Ética para Experimentação Animal da Universidade Federal Rural de
611 Pernambuco (UFRPE), licença nº 057/2015 CEUA/UFRPE.

612

613 *2.1. Reagentes e Químicos*

614 Com exceção dos especificados, todos os químicos e reagentes foram adquiridos
615 da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Um diluidor contendo 25 g de Glicose, 5 g de
616 leite em pó desnatado, 3,3 g de sucrose, 0,25 g de citrato de sódio, 50 UI/mL penicilina,
617 50 µg/mL estreptomicina, 0,25 mg/mL gentamicina e 20 mM HEPES, com

618 osmolaridade de 310 mOsm/kg e pH de 7,1 foi utilizado como meio controle ao longo
619 deste estudo.

620

621 2.2. *Estudo Preliminar*

622 Em um estudo preliminar, foi investigada a associação entre os níveis seminais e
623 séricos de L-carnitina e as variáveis da qualidade espermática. Este estudo foi baseado
624 em ejaculados oriundos de 14 garanhões da raça Quarto de Milha, 1 ejaculado de cada
625 garanhão (n = 14) com idade entre 4 e 8 anos, de fertilidade provada, mantidos em três
626 diferentes haras localizados no Município de Camaragibe-PE (7°57'04.7"S e
627 35°00'41.7"W). Todos os animais foram mantidos em baias individuais, tiveram livre
628 acesso à água e feno e foram suplementados com 5 kg de ração concentrada por dia.

629 Amostras de sêmen foram obtidas por meio da utilização de vagina artificial
630 (modelo Botucatu), e a fração gel foi separada e desprezada. Imediatamente após a
631 colheita, as amostras foram submetidas à avaliação subjetiva em microscópio óptico
632 com contraste de fase (Olympus, Tokyo, Japan; 100 X) para motilidade e vigor.

633 Posteriormente, a concentração espermática foi determinada utilizando câmara
634 de Neubauer. Em seguida, o volume total de cada ejaculado foi dividido em duas partes,
635 sendo uma das partes processada de acordo com o descrito por Stradaoli et al. (2000).
636 O sêmen foi centrifugado a 600 x g por 15 minutos e, após filtração através de um filtro
637 de seringa descartável de 0,45 µm (Cellulose Ester Filter, HAWG04700, Merck-
638 Millipore, USA), alíquotas de 1 mL de plasma seminal foram armazenadas a - 20 °C até
639 análise. A outra parte foi diluída para atingir a concentração de 50 x
640 10⁶espermatozoides/mL, utilizando-se meio à base de leite desnatado, refrigerada a 5 °C
641 utilizando-se caixa de transporte isotérmica e encaminhada ao laboratório para análises

642 de cinética espermática e integridade das membranas plasmática e acrosomal, como
643 descrito abaixo.

644 Amostras de sangue foram colhidas por venopunção da jugular em tubos
645 Vacutainer[®] heparinizados, antes da colheita de sêmen. As amostras foram centrifugadas
646 a 1500 x g por 10 minutos, o plasma foi separado e armazenado a -20 °C até a análise.

647

648 *2.3. Desenho Experimental*

649 Quatro ejaculados, colhidos uma vez por semana, de quatro garanhões Quarto de
650 Milha, foram utilizados neste experimento. Imediatamente após colheita, a fração gel foi
651 separada e rejeitada. Em seguida, o sêmen foi avaliado como anteriormente descrito e a
652 concentração espermática estimada utilizando câmara de Neubauer, sendo utilizados
653 aqueles ejaculados que apresentavam motilidade $\geq 60\%$ e vigor ≥ 3 , padrões mínimos
654 recomendados pelo CBRA (2013) para o sêmen de equinos.

655 O sêmen foi então diluído em meio à base de leite desnatado, para atingir a
656 concentração de 50×10^6 espermatozoides/mL.

657 O sêmen diluído foi transportado para o laboratório em caixas isotérmicas a
658 temperatura ambiente. No laboratório, o sêmen foi dividido para formação dos grupos
659 experimentais, aos quais foram adicionados L-carnitina para obter três diferentes
660 concentrações finais: 0 (controle), 0,5, 1 e 2 mM. As diferentes preparações foram
661 mantidas em tubos eppendorf (0,5 mL) tampados e acondicionados num refrigerador
662 (Panasonic NR-BT48PV1WB) a 5 °C.

663 A qualidade espermática foi avaliada imediatamente após atingir 5 °C (0 h) e
664 após 24, 48 e 72 h de armazenamento. Antes das análises, as amostras foram incubadas
665 por 5 minutos a 37 °C.

666

667 2.4. *Análise da Motilidade*

668 A avaliação da motilidade espermática foi realizada em Sistema de Análise
669 Espermática Computadorizada (CASA; SCATM, Microptics, S.L., Version 5.1,
670 Barcelona, Spain) utilizando os seguintes *settings*: magnificação 100 x; número de
671 imagens 25; imagens por segundo 24; área de cabeça 4 a 75 μm^2 ; VAP: lento 10 $\mu\text{m/s}$ <
672 médios 45 $\mu\text{m/s}$ < rápidos 90 $\mu\text{m/s}$; progressividade 75% STR; circular 50% LIN.

673 Uma alíquota (5,0 μL) da amostra foi colocada sobre lâmina e coberta com
674 lamínula (18x18 mm), ambas pré-aquecidas a 37 °C e avaliadas em microscopia
675 contraste de fase (Eclipse 50i, Nikon, Japan). Para cada amostra, pelo menos 500
676 espermatozoides foram registrados em cinco campos aleatórios não consecutivos, pelo
677 mesmo operador.

678

679 2.5. *Citometria de fluxo*

680 Os microtubos contendo as amostras refrigeradas foram levados ao banho-maria
681 (37 °C), durante 5 minutos. Foram retirados 300 μL de cada amostra e adicionado 1 mL
682 de PBS (Fosfato Salino Tamponado) e realizada a centrifugação (600 x *g* por 10
683 minutos). Em seguida, o sobrenadante foi retirado e o *pellet* ressuspenso em 90 μL de
684 PBS e dividido em 3 alíquotas de 30 μL , as quais foram utilizadas para análise de
685 integridade das membranas plasmática e acrossomal, produção de ROS intracelular e
686 estabilidade da membrana plasmática.

687 Para análise de integridade das membranas plasmática e acrossomal (iPAM), as
688 amostras foram incubadas a 37 °C por 10 minutos com 1 μL de FITC-conjugada ao
689 *Peanut agglutinin* (FITC-PNA; 200 $\mu\text{g/mL}$) e 2 μL de iodeto de propídio (IP; 0,5
690 mg/mL) em PBS. Após coloração, os espermatozoides foram fixados com 5,0 μL de
691 paraformaldeído a 4%, incubadas por 10 min à temperatura ambiente e avaliados.

692 Os espermatozoides foram classificados como portadores de: membranas
693 plasmática e acrossomal íntegras (IP-/PNA-), membranas plasmática íntegra e
694 acrossomal danificada (IP-/PNA+), membranas plasmática danificada e acrossomal
695 íntegra (IP+/PNA-) e membranas plasmática e acrossomal danificadas (IP+/PNA+).

696 A produção de ROS intracelular foi mensurada pela incubação dos
697 espermatozoides com 2 μ L de CM-H₂DCFDA (0,5 mM em DMSO; Molecular Probes,
698 Life Technologies, Eugene, USA) por 30min. a 37 °C. Em seguida, as amostras foram
699 centrifugadas (600g por 10 minutos) para remover o fluorocromo não ligado, o
700 sobrenadante foi desprezado e as amostras ressuspensas em 30 μ L de PBS, seguido pela
701 adição de 1 μ L de iodeto de propídio (IP; 0,5 mg/mL em PBS).

702 Depois de coradas, as amostras foram fixadas em paraformaldeído a 4%,
703 incubadas por 5 min. à temperatura ambiente e avaliadas. Apenas os dados das células
704 vivas foram usados para análise estatística. As populações foram separadas de acordo
705 com a intensidade de fluorescência e classificadas em: células com baixos níveis de
706 ROS e membranas íntegras (DCFDA-/IP-), células com altos níveis de ROS e
707 membrana plasmática íntegra (DCFDA+/IP-) e células com membrana plasmática
708 danificada (IP+).

709 Para análise da estabilidade de membrana plasmática, alíquotas de 30 μ L de
710 sêmen foram incubadas com 1 μ L YO-PRO[®]-1 iodide (YP; 1mM em DMSO)
711 (Molecular Probes, Life Technologies, Eugene, USA) a 37 °C por 15min. Após
712 incubação, 1 μ L de merocianina 540 (M540; 54Mm em DMSO) foi adicionado e, em
713 seguida, as amostras foram fixadas em 4% de paraformaldeído, incubadas por 5 min. à
714 temperatura ambiente e avaliadas. Seguindo a metodologia descrita por Steckler et al.
715 (2015), foram consideradas células viáveis com membrana íntegra (YP-/M540-), células
716 viáveis com membrana desestabilizada (YP-/M540+), células não viáveis com

717 membrana íntegra (YP+/M540-) e células não viáveis com membrana desestabilizada
718 (YP+/M540+).

719 Todas as análises foram realizadas utilizando o citômetro de fluxo
720 AmnisImageStream^{®x} Mark II (EMD Millipore Corp.), equipado com microscópio com
721 objetiva de 60x, com taxa de imagem de 5000 células/seg. O tamanho das células e a
722 velocidade do fluxo foi de 7,0 µm e 44 mm/seg., respectivamente. A aquisição das
723 imagens brutas foi obtida através do software INSPIRE[®]. As análises das imagens
724 brutas foram realizadas através do software IDEAS[®](versão 6.0).

725 Um laser de excitação de 488 nm com intensidade definida para 55,0 mV
726 (PNA/IP), 80 mV (DCFDA/IP) e 100 mV (YP/M540) foi utilizado. Aproximadamente
727 5000 eventos foram colhidos por amostra. FITC-PNA, CM-H₂DCFDA e YP foram
728 coletados no canal 2 (505-560 nm) e IP foi coletado no canal 5 (640-745 nm). As
729 imagens da M540 foram coletadas no canal 3 (560-595nm).

730

731 2.6. Dosagem da L-carnitina

732 As concentrações de LC no plasma sanguíneo e no plasma seminal foram
733 determinadas utilizando L-CarnitineEnzymatic UV test (Roche DiagnosticsGmbH,
734 Mannheim, Germany), de acordo com as instruções do fabricante. Após uma etapa de
735 desproteinização, alíquota de 500µL de cada amostra foi utilizada para o teste, seguindo
736 o protocolo padrão.

737 Uma alíquota de 300µL foi retirada para análise no espectrofotômetro UV-
738 Visível (AsysHiTech UVM 340, Biochrom, EUA), empregando-se microplacas de 96
739 poços. A absorbância do aduto foi medida em um comprimento de onda de 340 nm, no
740 início, meio e fim da reação, cujos dados foram utilizados na fórmula para o cálculo da

741 concentração de LC. Todas as amostras foram preparadas e analisadas em triplicata. As
742 concentrações de L-carnitina foram expressas em nmol/mL.

743

744 *2.7. Análise Estatística*

745 As análises dos dados foram realizadas utilizando o software GraphPadInStat
746 versão 3.10. Os dados foram testados para distribuição normal usando o teste
747 Kolmogorov–Smirnov. Quando necessário, os dados foram transformados por meio do
748 log ou raiz quadrada para obter normalidade de distribuição.

749 A análise de correlação de Pearson foi realizada para investigar a relação entre a
750 concentração de LC no plasma seminal e sanguíneo e os parâmetros de qualidade
751 espermática. As variáveis expressas em porcentagem foram transformadas por arco seno
752 (arco seno $\sqrt{P/100}$).

753 A influência da L-carnitina e tempo de armazenamento sobre as variáveis de
754 qualidade seminal foram testadas por análise de variância (ANOVA) para mensurações
755 repetidas, seguidas pelo teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer. As diferenças
756 foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

757

758 **3. Resultados**

759 Os dados das concentrações de L-carnitina no plasma seminal e sérico, assim
760 como os coeficientes de correlação entre as variáveis espermáticas e as concentrações
761 seminais e séricas de L-carnitina de 14 garanhões da raça Quarto de Milha estão
762 apresentados na Tabela 1.

763 Houve correlação significativa entre a concentração seminal de LC e as
764 variáveis: concentração espermática ($P < 0,05$) e integridade das membranas plasmática
765 e acrossomal ($P < 0,01$). Não houve correlação significativa entre a concentração

766 seminal e a concentração sérica de LC, assim como não houve correlação significativa
767 entre a concentração sérica de LC e os parâmetros espermáticos analisados ($P > 0,05$).

768 O tempo de armazenamento teve efeito negativo sobre todas as variáveis de
769 motilidade avaliadas ($P < 0,05$). No entanto, a suplementação do diluidor com L-
770 carnitina atenuou estes efeitos.

771 A motilidade total não diferiu entre os grupos no momento 0 h ($P > 0,05$).
772 Entretanto, após 24, 48 e 72 h de armazenamento, as amostras tratadas com 1 mM de L-
773 carnitina apresentaram valores de motilidade total significativamente maiores ($P < 0,05$)
774 do que as do grupo controle. Efeito similar também foi evidente nas amostras tratadas
775 com L-carnitina 2 mM, após 48 h de armazenamento (Tabela 2).

776 Não houve diferença significativa para motilidade progressiva entre os grupos
777 controle e os tratados com L-carnitina a 0 ou 24 h. No entanto, após 48 h de
778 armazenamento amostras suplementadas com L-carnitina 2 mM resultou em motilidade
779 progressiva significativamente maior ($P < 0,05$) do que as do grupo controle (Tabela 2).

780 Não houve diferença significativa na motilidade progressiva entre os grupos
781 após 72 horas de armazenamento ($P > 0,05$; Tabela 2). Não houve efeito do tratamento
782 nas demais variáveis da cinética espermática em qualquer tempo analisado ($P > 0,05$).

783 Não houve diferença significativa entre grupos, nos distintos tempos de
784 armazenamento, para integridade das membranas plasmática e acrossomal, produção
785 intracelular de ROS e estabilidade da membrana (Fig. 1A-C).

786

787 **4. Discussão**

788 O estudo preliminar demonstrou haver correlação positiva entre os níveis de L-
789 carnitina no plasma seminal e a concentração espermática, e integridade das membranas
790 plasmática e acrossomal. Estes resultados são similares àqueles previamente reportados

791 por Stradaoli et al. (2000), os quais relataram haver correlação positiva entre os níveis
792 de L-carnitina no plasma seminal com a concentração espermática de garanhões da raça
793 Maremmano. Além disso, correlações positivas entre níveis de L-carnitina no plasma
794 seminal e a fertilidade de homens tem sido descritas (De Rosa et al., 2005; Sheikh et al.,
795 2007). Por conseguinte, estes resultados podem indicar que a L-carnitina pode ser um
796 marcador da qualidade seminal.

797 O presente experimento demonstrou que a adição de L-carnitina a um diluidor à
798 base de leite desnatado influenciou a motilidade espermática de maneira tempo e dose-
799 dependente, promovendo melhorias significativas na longevidade espermática, refletida
800 sobre as variáveis de motilidade total e progressiva, observadas nos grupos adicionados
801 com L-carnitina 1 e 2 mM. Os resultados deste estudo estão de acordo com relatos
802 anteriores dos efeitos benéficos da L-carnitina sobre espermatozoides de garanhões
803 (Lisboa et al., 2012).

804 A adição de L-carnitina a um diluidor comercial foi efetivo em melhorar a
805 qualidade seminal, apresentando maior efeito sobre a integridade da membrana
806 plasmática e a cinética de espermatozoides equinos armazenados a 5 °C por 48 horas
807 (Lisboa et al., 2014). Além disso, a qualidade seminal de garanhões tem melhorado
808 significativamente após suplementação do diluidor com L-carnitina, permitindo que os
809 espermatozoides sejam armazenados à temperatura ambiente durante pelo menos 72
810 horas (Gibb et al., 2014). Estes relatos fortalecem nossas observações.

811 A L-carnitina tem sido implicada no metabolismo espermático, sendo
812 responsável pelo transporte de ácidos graxos poliinsaturados para dentro das
813 mitocôndrias para geração de ATP através da β -Oxidação (Matalliotakis et al., 2000).
814 Estudos prévios mostraram que há redução significativa na concentração intracelular de
815 L-carnitina (Suter e Holland, 1979) e Acetil-L-Carnitina (Grizard et al., 1992) de

816 espermatozoides humanos, após a criopreservação. Desta forma, tem sido postulado que
817 a diminuição da motilidade espermática após a criopreservação do sêmen pode estar
818 associada com uma queda na concentração de carnitina do espermatozoide (Agarwal,
819 2004). Estes resultados sugerem que as vias metabólicas para a produção de ATP dos
820 espermatozoides refrigerados são comprometidas ao longo do tempo, interferindo
821 negativamente na cinética espermática.

822 Neste sentido, é razoável sugerir que a suplementação exógena de L-carnitina foi
823 capaz de manter a concentração intracelular por um período maior, mantendo as vias
824 metabólicas para a produção de ATP por até 48 horas de refrigeração, sendo visualizado
825 na manutenção das variáveis de cinética das amostras em que a L-carnitina foi
826 adicionada.

827 Estudo recente demonstrou que a adição de L-carnitina a um diluidor
828 quimicamente definido prolongou a sobrevivência de espermatozoides equinos
829 armazenados por 72 horas à temperatura ambiente, por suportar a produção de ATP
830 mitocondrial, enquanto minimizou tanto a depleção de ATP quanto os efeitos
831 prejudiciais dos subprodutos metabólicos, tais com as ROS (Gibb et al., 2015).

832 Em contraste, a adição de L-carnitina não teve efeito sobre as variáveis de
833 integridade das membranas plasmáticas e acrossomal, estabilidade da membrana e
834 concentração de ROS intracelular durante este experimento. É digno de nota que
835 aqueles autores (Gibb et al., 2015) utilizaram concentrações de L-carnitina
836 consideravelmente maiores que as utilizadas neste experimento, associado a um meio
837 quimicamente definido e armazenamento à temperatura ambiente. Além disso,
838 diferenças entre raças e procedimentos analíticos, talvez torne difícil a comparação entre
839 os estudos.

840 Conclui-se que houve correlação positiva entre L-carnitina no plasma seminal
841 com concentração espermática e integridade das membranas plasmática e acrossomal de
842 espermatozoide de garanhões. Além disso, a adição de L-carnitina (1 e 2 mM) ao
843 diluidor à base de leite desnatado preserva a motilidade de espermatozoides equinos
844 armazenados a 5 °C por até 48 h. Estes resultados podem promover a aplicação da L-
845 carnitina em tecnologias da reprodução assistida.

846

847 **Declaração de interesses dos autores**

848 Não há interesses concorrentes que tenham sido declarados.

849

850

851

852 **Fonte de financiamento**

853 Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do
854 Estado de Pernambuco (FACEPE).

855

856 **Agradecimentos**

857 Os autores agradecem a FACEPE pelo financiamento da pesquisa.

858

859 **Referências**

860 1. Agarwal, A. (2004) Carnitines and male infertility. Reproductive BioMedicine
861 Online. 8, 376-384.

862 2. Aliabadi, E., Karimi, F. and Talaei-Khozani, T.(2013) Effects of L-carnitine and
863 pentoxifylline on carbohydrate distribution of mouse testicular sperm membrane. Iranian
864 Journal of Medical Sciences. 38, 107-115.

- 865 3. Aurich J.E., Ktibne J A., H. Hoppe and Aurich C.(1996) Seminal plasma affects
866 membrane integrity and motility of equine spermatozoa after cryopreservation.
867 *Theriogenology* 46, 791-797.
- 868 4.Banihani, S., Agarwal, A., Sharma, R.and Bayachou, M.(2014) Cryoprotective effect
869 of L-carnitine on motility, vitality and DNA oxidation of human spermatozoa.
870 *Andrologia*. 46, 637-641.
- 871 5. Brinsko S.P., Crockett E.C., and Squires E.L. (2000) Effect of centrifugation and
872 partial removal of seminal plasma on equine spermatozoal motility after cooling and
873 storage. *Theriogenology* 54,129-136.
- 874 6. CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (2013). Manual
875 para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3.ed. Belo Horizonte, 104 p.
- 876 7. De Rosa, M., Boggia, B., Amalfi, B., Zarrilli, S., Vita, A., Colao, A. and Lombardi,
877 G. (2005) Correlation between seminal carnitine and functional spermatozoal
878 characteristics in men with semen dysfunction of various origins. *Drugs R D*. 6, 1-9.
- 879 8. El-Nattat, W.S., El-Sheshtawy, R.I. and Mohamed, A.A.. (2011) Effect of L-carnitine
880 on semen characteristics of chilled rabbit semen. *Global Journal of Biotechnology &*
881 *Biochemistry*. 6, 8-12.
- 882 9. Gibb Z., Lambourne S.R., Aitken R.J (2014). Pyruvate and L-carnitine are pro-
883 survival factors for stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*. 34, 31.
- 884 10. Gibb Z., Lambourne S.R., Quadrelli J., Smith N.D. and Aitken R.J. (2015) L-
885 carnitine and pyruvate are prosurvival factors during the storage of stallion spermatozoa
886 at room temperature. *Biology of Reproduction*. 104, 1–9.

- 887 11. Grizard, G., Vignon, N. and Boucher, D. (1992) Changes in carnitine and
888 acetylcarnitine in human semen during cryopreservation. *Human Reproduction*.7, 1245-
889 1248.
- 890 12. Haadem C.S., Nødtvedt A., Farstad W. and Thomassen R. (2015) A retrospective
891 cohort study on fertility in the Norwegian Coldblooded trotter after artificial
892 insemination with cooled, shipped versus fresh extended semen. *ActaVeterinaria*
893 *Scandinavica* 57-77
- 894 13. Lindahl, J., Dalin, A., Stuhmann, G. and Morrell, J.M. (2012) Stallion spermatozoa
895 selected by single layer centrifugation are capable of fertilization after storage for up to
896 96 h at 6°C prior to artificial insemination. *ActaVeterinaria Scandinavica*. 54, 1-40.
- 897 14. Lisboa, F. P.; Hartwig, F. P. ;Maziero, R. R. D. ; Monteiro, G. A. ; Papa, F. O. ;
898 Dell'aquajr (2012). Use of L-carnitine and acetyl-L-carnitine in cooled-stored stallion
899 semen. In: 6th International Symposium on Stallion Reproduction (ISSR), Viena.
900 *Journal of Equine Veterinary Science*. 32, 493-494.
- 901 15. Lisboa, F. P.; Hartwig, F.P. ; Freitas-dell'aqua, C. P. ; Hartwig, F. P. ; Papa, F.O. ;
902 Dell'aqua, J.A. (2014) . Improvement of cooled equine semen by addition of carnitines.
903 In: International Symposium on Equine Reproduction, Hamilton. *Journal of Equine*
904 *Veterinary Science*. 34, 48-48.
- 905 16. Loomis, P.R. (2001) The equine frozen semen industry. *Animal Reproduction*
906 *Science* 68, 191–200.
- 907 17. Manne-In, S., Parmornsupornvichit, S., Kraiprayoon, S., Tharasanit, T.,
908 Chanapiwat, P. andKaeoket, K. (2014) L-carnitine Supplemented Extender Improves
909 Cryopreserved-thawed Cat Epididymal Sperm Motility. *Asian-Australasian Journal of*
910 *Animal Sciences*. 27, 791-796.

- 911 18. Matalliotakis, I., Koumantaki, Y., Evageliou, A., Matalliotakis, G., Goumenou,
912 A.and Koumantakis, E. (2000) L-Carnitine levels in the seminal plasma of fertile and
913 infertile men: correlation with sperm quality. *International Journal of Fertility*.45, 236-
914 240.
- 915 19. Neuman, S.L., Lin, T.L. and Heste, P.Y. (2002) The effect of dietary carnitina on
916 semen traits of white Leghorn roosters. *Poultry Science*, 81, 495-503.
- 917 20. Sarıozkan, S., Ozdamar, S., Turk, G., Canturk, F. and Yay, A. (2014) In vitro effects
918 of L-carnitine and glutamine on motility, acrosomal abnormality, and plasma membrane
919 integrity of rabbit sperm during liquid-storage. *Cryobiology*. 68, 349–353.
- 920 21. Sheikh, N., Goodarzi, M., Bab Al-Havaejee, H., Safari, M., Amiri, I., Najafi,
921 R.and Hadeie, J. (2007)L-Carnitine Level in Seminal Plasma of Fertile and Infertile
922 Men *Journal of Research in Health Sciences*.7, 43-48.
- 923 22. Stradaoli, G., Sylla, L., Zelli, R., Verini, S. A., Chiodi, P., Arduini, A. and Monaci,
924 M. (2000) Seminal carnitine and acetylcarnitine content and carnitineacetyltransferase
925 activity in young Maremmano stallions. *Animal Reproduction Science*. 64, 233-245.
- 926 23. Stradaoli, G., Sylla, L., Zelli, R., Chiodi, P. and Monaci, M. (2004) Effect of L-
927 carnitine administration on the seminal characteristics of oligoasthenospermic stallions.
928 *Theriogenology*. 62, 761-777.
- 929 24. Steckler, D. , Stout T.A.E. , DurandtC. ,Nöthling J.O. (2015) Validation of
930 merocyanine 540 staining as a technique for assessing capacitation-related membrane
931 destabilization of fresh dog sperm. *Theriogenology*. 83, 1451–1460.
- 932 25. Suter, D.A.I. and Holland, M.K. (1979) The concentrations of free L-carnitine and
933 L-O-acetylcarnitine in spermatozoa and seminal plasma of normal, fresh and frozen
934 human semen. *Fertility and Sterility*. 31, 541-544.

935 26. Watson, P.F. (2000) The causes of reduced fertility with
936 cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*. 60-61, 481-492.

937 27. Zhang, W., Li, F., Cao, H., Li, C., Du, C., Yao, L., Mao, H. and Lin, W. (2015)
938 Protective effects of l-carnitine on astheno- and normozoospermic human semen
939 samples during cryopreservation. *Zygote*. 1-8.

940

941

942

943

944

945

946

947

948

949

950

951

952

953

954

955

956

957

958

959

960

961

962

963

964

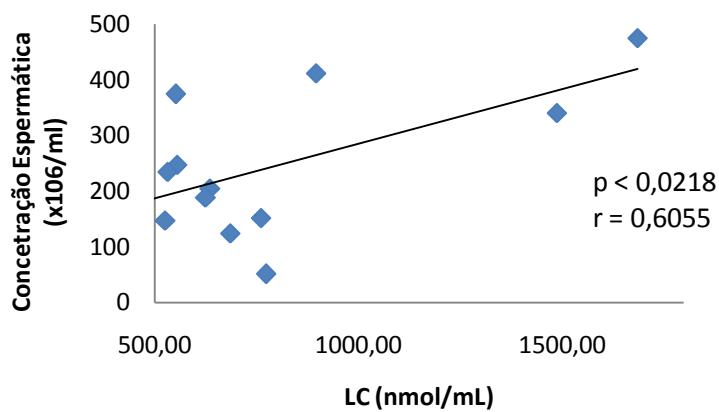
965

966 **Tabela 1.** Correlação entre os níveis seminais de L-Carnitina e os níveis séricos de L-Carnitina, concentração
 967 espermiática e integridade das membranas plasmática e acrossomal de 14 garanhões Quarto de Milha

Parâmetro	Média	Desvio Padrão	Limites	Valor de p	Valor de r
L-Carnitina no plasma seminal (nmol/mL)	763,22	371,52	466,10-1686,80	-	-
L-Carnitina no plasma sanguíneo (nmol/mL)	140,16	11,32	126,00-159,00	0,7435	0,0092
Concentração Espermática (x 10 ⁶ /mL)	238,57	119,70	51,00-475,00	0,0218	0,6055
Integridade de Membrana Plasmática e acrossomal (%)	56,36	16,96	33,00-92,00	0,0056	0,6971

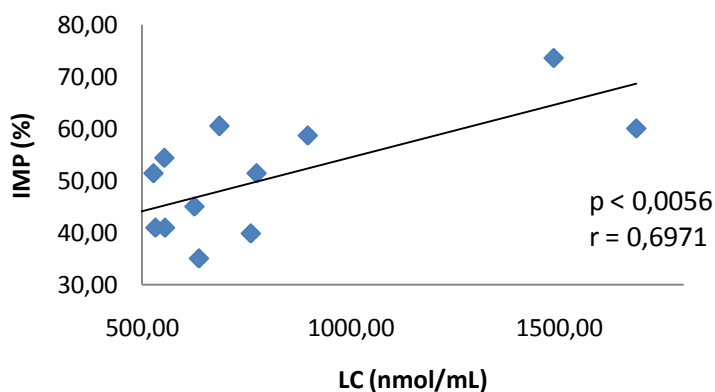
968

969



970

971

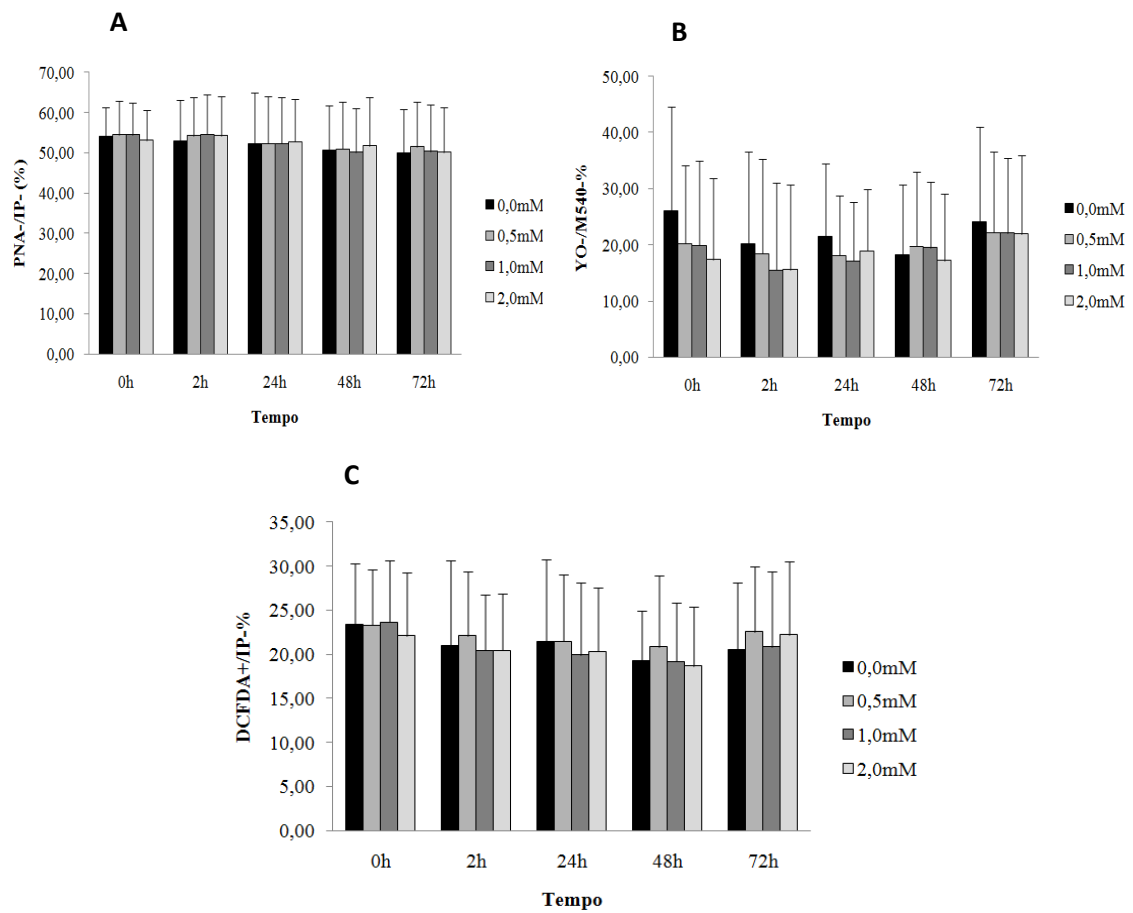


972

973 **Figura 1.** Análise de correlação entre a concentração seminal de L- carnitina (LC) e a concentração espermiática e a
 974 integridade de membrana plasmática e acrossomal de 14 garanhões Quarto de Milha.

975

976



977

978

979 **Figura 2.** Média e Desvio Padrão da integridade das membranas plasmática e acrossomal (A), estabilidade de
980 membrana (B) e concentração intracelular de ROS (C) de espermatozoides equinos submetidos à refrigeração por 72h
981 na presença de diferentes concentrações de L-carnitina.

Tabela 2. Média e Desvio Padrão dos parâmetros cinéticos de espermatozoides equinos submetidos à refrigeração por até 72h na presença de diferentes concentrações de L-carnitina

L-Carnitina (mM)	TEMPO (h)	MT(%)	MP(%)	RAP(%)	VCL(μm/s)	VSL(μm/s)	VAP(μm/s)	LIN(%)
0	0	68,20 ± 14,53 ^A	26,42 ± 10,44 ^A	47,90±24,05 ^A	128,82±29,41 ^A	67,02±18,45 ^A	106,78±29,88 ^A	52,00±9,12 ^{AB}
	24	56,07 ± 15,23 ^{bb}	22,46 ± 10,40 ^A	35,96±18,74 ^{AB}	116,74±31,26 ^A	64,73±16,95 ^A	99,45±29,56 ^{A^B}	56,24±9,72 ^A
	48	44,58 ± 16,64 ^{bc}	13,225 ± 8,08 ^{bb}	24,98±17,63 ^{BC}	109,70±29,52 ^{AB}	47,57±12,65 ^B	86,68±24,67 ^B	44,66±10,96 ^B
	72	32,46 ± 19,29 ^{bd}	8,22 ± 4,85 ^B	16,48±18,98 ^C	94,75±32,32 ^B	42,72±11,95 ^B	66,65±24,48 ^C	47,7±13,92 ^{AB}
0,5	0	71,3 ± 12,08 ^A	28,41 ± 10,75 ^A	47,55±23,87 ^{AB}	127,58±30,31 ^A	67,14±19,15 ^A	104,81±30,48 ^A	52,75±9,31 ^A
	24	63,85 ± 15,21 ^{abAB}	25,8 ± 9,99 ^A	43,47±19,31 ^{AB}	119,04±19,71 ^{AB}	64,32±14,72 ^{AB}	100,03±18,58 ^A	54,3±10,94 ^A
	48	53,12 ± 19,99 ^{abB}	17,91 ± 10,81 ^{abB}	33,86±22,65 ^B	113,47±27,87 ^{AB}	53,36±16,33 ^B	92,31±26,07 ^A	47,31±11,14 ^{AB}
	72	39,68 ± 21,83 ^{abC}	8,13 ± 5,09 ^C	21,53±22,02 ^C	99,89±37,86 ^B	37,77±11,60 ^C	73,78±30,17 ^B	40,98±15,01 ^B
1,0	0	76,31 ± 11,54 ^A	28,43 ± 9,78 ^A	53,04±25,68 ^A	133,69±29,02 ^A	67,33±18,89 ^A	111,36±30,91 ^A	50,60±10,41 ^A
	24	67,11 ± 14,11 ^{aA}	24,83 ± 10,26 ^{AB}	43,74±16,62 ^{AB}	121,35±22,44 ^{ABC}	61,81±16,36 ^{AB}	101,84±21,94 ^{AB}	50,89±9,53 ^A
	48	56,49 ± 16,35 ^{abB}	17,58 ± 10,13 ^{abB}	34,32±20,89 ^{BC}	111,91±27,12 ^{BC}	50,24±17,37 ^{BC}	89,40±25,12 ^{BC}	45,72±14,87 ^{AB}
	72	45,47 ± 19,50 ^{abC}	9,26 ± 5,57 ^C	24,92±21,76 ^C	102,63±30,69 ^C	39,27±11,45 ^C	77,10±25,24 ^C	40,07±13,71 ^B
2,0	0	72,72 ± 13,87 ^A	28,15 ± 12,79 ^A	48,68±23,11 ^A	124,40±26,62 ^A	64,85±17,99 ^A	102,83±25,60 ^A	52,25±9,99 ^{AB}
	24	63,74 ± 15,29 ^{abAB}	28,01 ± 11,07 ^A	41,79±18,39 ^A	115,70±19,58 ^{AB}	67,71±17,07 ^A	99,40±19,62 ^A	58,53±11,35 ^A
	48	56,50 ± 18,47 ^{abB}	21,18 ± 10,37 ^{aA}	36,98±22,50 ^A	113,45±26,17 ^{AB}	59,22±16,99 ^A	94,90±24,54 ^A	53,34±15,11 ^{AB}
	72	40,66 ± 19,47 ^{abC}	11,41 ± 7,42 ^B	20,29±18,31 ^B	99,67±28,85 ^B	43,00±13,42 ^B	74,78±23,79 ^B	44,22±12,33 ^B

983
984
985

Diferentes letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa (P<0,05) entre os tratamentos no mesmo tempo. Diferentes letras maiúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa (P<0,05) entre os tempos no mesmo tratamento. MT: Motilidade Total; MP: Motilidade Progressiva; RAP: Percentual de Espermatozoides Rápidos; VCL: Velocidade Curvilínea; VSL: Velocidade em Linha Reta; VAP: Velocidade Média do Percurso; LIN: Linearidade.