

Criopreservação de sêmen de garanhões: entendimento da fisiologia e metabolismo espermático como estratégias para melhores resultados

Cryopreservation of stallion semen: understanding sperm physiology and metabolism as strategies for better results

Renata Lançon¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Uberlândia (FMVZ – UFU),
Uberlândia, MG, Brasil

Resumo

O espermatozoide é uma célula altamente especializada e única, que possui um metabolismo complexo e energético essencial para sua motilidade e sobrevivência, especialmente no processo de fecundação. A criopreservação é uma ferramenta valiosa para conservar o sêmen equino por períodos indefinidos, permitindo a inseminação artificial. No entanto, os resultados dessa técnica apresentam variabilidade, com taxas de concepção frequentemente mais baixas quando comparadas à monta natural ou sêmen fresco. Os espermatozoides de garanhões utilizam principalmente a fosforilação oxidativa mitocondrial (FOSOX) para gerar ATP, o que tem implicações significativas para a fertilidade e conservação do sêmen. A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) como subprodutos dessa via metabólica pode ser benéfica em curto prazo, mas em excesso, pode levar à apoptose e deterioração das células espermáticas. A presença de glicose nas soluções de diluição, em concentrações supra-fisiológicas, tem sido questionada, dado que pode promover a produção excessiva de ROS, comprometendo a viabilidade dos espermatozoides. O conceito de "flexibilidade metabólica" sugere que a capacidade de alternar entre diferentes fontes de energia pode melhorar a viabilidade dos espermatozoides em condições adversas. Este artigo revisa o metabolismo espermático e propõe novas estratégias baseadas em intervenções metabólicas para otimizar os resultados da conservação do sêmen equino. Essas abordagens podem incluir ajustes na composição dos diluidores e o uso de antioxidantes e substâncias que modulem o metabolismo celular, visando melhorar a fertilidade dos espermatozoides criopreservados e reduzir a variabilidade nos resultados de inseminação artificial.

Palavras-chave: congelamento de sêmen; cadeia de transporte de elétrons; espécies reativas de oxigênio; produção de ATP.

Abstract

The spermatozoon is a highly specialized and unique cell with a complex and energy-demanding metabolism, essential for its motility and survival, particularly during fertilization. Cryopreservation is a valuable tool for preserving equine semen for indefinite periods, allowing artificial insemination. However, the results of this technique show variability, with conception rates often lower compared to natural mating or fresh semen. Stallion spermatozoa primarily use mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) to generate ATP, which has significant implications for fertility and semen preservation. The production of reactive oxygen species (ROS) as byproducts of this metabolic pathway can be beneficial in the short term, but excess can lead to apoptosis and sperm cell deterioration. The presence of glucose in dilution solutions at supra-physiological concentrations has been questioned, as it may promote excessive ROS production, compromising sperm viability. The concept of "metabolic flexibility" suggests that the ability to switch between different energy sources could enhance sperm viability under adverse conditions. This paper reviews sperm metabolism and proposes new strategies based on metabolic interventions to optimize equine semen preservation outcomes. These approaches may include adjustments to the composition of diluents and the use of antioxidants and substances that modulate cellular metabolism, aiming to improve the fertility of cryopreserved spermatozoa and reduce variability in artificial insemination results.

Keywords: ATP production; electron transport chain; reactive oxygen species; semen freezing.

Introdução

O espermatozoide é único. Uma célula que é gerada em um organismo para desempenhar a sua função (fecundação) em outro organismo (fêmea), eles são expostos a ambientes muito diferentes com

substratos energéticos indiscutivelmente diferentes, e devem passar por capacitação, hiperativação, reação do acrossômica e fecundação, em momentos e locais específicos no trato genital da égua. São processos fisiológicos que exigem altos níveis de energia.

A criopreservação é uma ferramenta importante para preservar os espermatozoides de qualquer espécie por um período de tempo indeterminado. A inseminação artificial (IA) com sêmen congelado tem se tornado cada vez mais frequente na criação de animais domésticos, incluindo os equinos (Al-Essawe et al., 2018). Entretanto, há grande variabilidade de resultados entre indivíduos e algumas vezes, as taxas de concepção ainda são menores quando comparadas com monta natural, sêmen fresco ou refrigerado (Bradford; Buhr, 2002).

Espermatozoides de várias espécies de mamíferos diferem nas principais vias metabólicas que utilizam para manter sua motilidade e sobrevivência (Storey, 2008). Os espermatozoides do garanhão dependem predominantemente da fosforilação oxidativa mitocondrial (FOSOX), em comparação com o metabolismo glicolítico (Gibb, 2014; Davila et al., 2015). FOSOX tem as vantagens de produzir rapidamente altos níveis de ATP e melhorar a motilidade das células em comparação com a glicólise (Tourmente et al., 2015), embora não sem um preço. Espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidas como um subproduto da FOSOX, com a mitocôndria sendo o principal local de produção de ROS pelo espermatozoide (Koppers et al., 2008). A curto prazo, altos níveis de ROS são indicativos de um metabolismo mitocondrial saudável do esperma e associados positivamente com a fertilidade a campo (Gibb, 2014). No entanto, os espermatozoides que são continuamente expostos a altos níveis de ROS esgotam suas reservas antioxidantes e, em última análise, se deterioram à medida que se envolvem na via intrínseca de apoptose para a morte celular (Aitken et al., 2012; Peña et al., 2011).

Então, pode-se afirmar que os espermatozoides de garanhões são células altamente especializadas com um metabolismo complexo. Estes estudos sugeriram uma grande dependência do ATP gerado pelas mitocôndrias nestas células (Ortega-Ferrusola et al., 2010), este aspecto foi confirmado (Gibb et al., 2015; Davila et al., 2016), e uma reação paradoxal entre a fertilidade do garanhão e a produção de O_2 mitocondrial tornou-se evidente, devido à intensa atividade mitocondrial destas células (Gibb et al., 2014). Essas descobertas desafiaram muitos conceitos amplamente assumidos entre clínicos e cientistas equinos em relação às fontes de energia em um diluidor de sêmen equino.

Um dos primeiros diluidores desenvolvidos foi o de Kenney, baseado em glicose e leite desnatado. Outros diluidores foram posteriormente desenvolvidos e inseridos no mercado, com diferentes soluções salinas e tampões, mas ainda com altas concentrações de glicose (Vidament et al., 2001; Vidament et al., 2012). As concentrações de glicose utilizadas estão normalmente acima das fisiológicas. Isto, juntamente com o fato da conhecida dependência do espermatozoide do garanhão ao metabolismo energético mitocondrial vem fazendo com que os pesquisadores reconsiderem os meios diluidores para preservação do sêmen equino (Hernandez-Aviles et al., 2021; Hernandez-Aviles et al., 2020).

Diante do exposto, este trabalho busca revisar conceitos de metabolismo espermático e sugerir como eles podem servir de estratégias para melhores resultados na manipulação do sêmen equino.

Metabolismo espermático

O espermatozoide, como qualquer outra célula em condições aeróbicas, enfrenta constantemente o paradoxo do oxigênio, de que ele é essencial para a vida, porém, o metabolismo oxidativo das moléculas biológicas pode ser potencialmente tóxico pela formação de muitas ROS que podem modificar as funções e a viabilidade celular (Baumber et al., 2000). O estresse oxidativo é determinado pelo desbalanço entre a produção e a degradação das ROS em um tecido. Os espermatozoides e o plasma seminal possuem várias enzimas e antioxidantes (não enzimáticos) que degradam as ROS a fim de evitar o dano celular. Existem três principais sistemas enzimáticos que foram descritos no plasma seminal: sistema glutatona peroxidase/reductase, superóxido dismutase e catalase. Além disso, vários outros componentes do plasma seminal podem agir como antioxidantes tais como vitamina E, vitamina C, urato, albumina, taurina e hipotaurina. Os métodos de preparação dos espermatozoides relacionados com biotécnicas da reprodução envolvem a remoção do plasma seminal, diminuindo sua proteção antioxidante e aumentando a susceptibilidade ao estresse oxidativo (Baumber et al., 2000).

Metabolismo celular é um mecanismo complexo de reações bioquímicas que convertem nutrientes em energia e moléculas responsáveis pela sobrevivência da célula. Estas reações requerem trocas de energia através de reações de oxido-redução que transferem elétrons de alta energia entre moléculas (Peña et al., 2024). Os produtos finais da via metabólica são energia (ATP), seus redutores ($NADH$ e $FADH_2$) e macromoléculas precursoras (Arnold et al., 2023).

Por um longo tempo assumiu-se que os espermatozoides eram células que produziam energia predominantemente pela via glicolítica, mas atualmente é sabido que a energia é proveniente de diferentes vias. Como dito anteriormente, o espermatozoide do garanhão, especificamente, produz grande parte de sua energia pela FOSOX, processo que ocorre na mitocôndria. Ainda, os primeiros estudos proteômicos nesta espécie mostraram abundante presença de proteínas envolvidas em diferentes vias de produção de energia, incluindo fosforilação oxidativa, glicólise e β -oxidação de ácidos graxos (Swegen et al., 2015), uma descoberta que foi confirmada em outros estudos proteômicos posteriores (Peña et al., 2024). Estes estudos destacaram a importância e a complexidade do metabolismo dos espermatozoides e levaram a continuidade das investigações metabólicas dos espermatozoides.

A glicólise é uma importante via metabólica para obtenção de energia que consiste basicamente em quebrar uma molécula de glicose (com 6 carbonos) em duas moléculas de piruvato (com 3 carbonos cada). Este processo resulta em um saldo de 2 ATPs e 2 NADHs (moléculas carregadoras de energia). A glicólise ocorre no citoplasma e é o início do processo de “respiração celular” e seus subprodutos irão para outras vias para produzir mais energia (em forma de ATP) essas vias podem ou não conter O_2 (aeróbicas – ciclo de Krebs ou anaeróbicas). Os piruvatos resultantes da glicólise entram na mitocôndria e são transformados em acetilcoenzima A, molécula que iniciará o ciclo de Krebs na matriz mitocondrial. O ciclo de Krebs produz mais 2 ATPs e aumenta a chance de extração de energia da molécula de glicose que foi quebrada através da formação de NADHs e $FADH_2$, que servirão de substrato para produção de mais ATPs durante o processo de FOSOX. Então, o processo de produção de energia na célula segue para a FOSOX (ou cadeia transportadora de elétrons), que ocorre na crista mitocondrial e produz mais 34 ATPs. Ao fim destes processos aeróbicos de produção de energia na célula, uma molécula de glicose resulta em 38 ATPs produzidos (2 da glicólise, 2 do ciclo de Krebs e 34 da FOSOX). Além da glicose, lipídeos e proteínas também podem servir de substratos para obtenção de energia. Essas substâncias também serão transformadas em acetilcoenzima A para que entrem no ciclo de Krebs e deem continuidade ao processo. A glicose também pode ser metabolizada pela via das pentoses fosfato, gerando NADPH, necessário para manter a glutatona em seu estado reduzido. A glutatona é cofator de diversas enzimas antioxidantes nos espermatozoides, como glutatona peroxidases, peroxiredoxinas e tioredoxinas (Scarlata et al., 2020; Bumanlag et al., 2022; Fernandez et al., 2019), sendo essencial para a homeostase nesses gametas. Resumidamente, a glicose alimenta enzimas glicolíticas no flagelo, o Ciclo de Krebs para geração de NADH e $FADH_2$ utilizados na crista mitocondrial, produzindo ATP via fosforilação oxidativa e gera NADPH para manter o equilíbrio redox (Peña et al., 2024).

A glicose tem sido a principal fonte energética adicionada aos diluidores de sêmen equinos, geralmente em concentrações suprafisiológicas. É conhecido que o excesso de glicose e o consumo de açúcares processados são causas de doenças no mundo ocidental, sendo introduzido o termo “carbotoxicidade” (Kroemer et al., 2018) para descrever esse fenômeno. Durante a glicólise, substâncias tóxicas podem ser geradas, especialmente quando dois grupos fosfato são removidos do intermediário gliceraldeído 3-fosfato (G3F), formando 3-fosfoglicerato (3FG) pela ação da enzima GAPDH, com produção de NADH a partir de NAD^+ . Quando há pouca disponibilidade de NAD^+ , ocorre acúmulo de glicoxal e metil-glicoxal (Kalapos et al., 2008), compostos oxoaldeídos que atacam proteínas, nucleotídeos e lipídios, contribuindo para a formação de produtos finais de glicação avançada (GAs), os quais alteram funções proteicas e prejudicam o metabolismo celular.

Os efeitos desses oxoaldeídos são combatidos por um sistema glutatona-dependente (Thornalley et al., 1993). Pesquisas recentes indicam que altas concentrações de glicose no meio podem predispor os espermatozoides à ferroptose — forma de morte celular programada dependente de Fe^{2+} e induzida pela formação de lipoperóxidos — caracterizada pela falha das defesas antioxidantes dependentes de glutatona (Li et al., 2020). A presença de ferroptose em espermatozoides de garanhões foi evidenciada recentemente (Ortiz-Rodriguez et al., 2020), sendo mais facilmente induzida em meios com alta glicose (Martin-Cano et al., 2024). O excesso de glicose pode reduzir os níveis de glutatona devido à produção excessiva de oxoaldeídos. A hiperglicemia também ativa a via do diacilglicerol (DAG), proteína quinase C (PKC) e NADPH-oxidase, promovendo produção excessiva de ROS e dano mitocondrial.

O piruvato é uma molécula fundamental para diversos aspectos do metabolismo. A disfunção do metabolismo do piruvato afeta especialmente células ou tecidos com alta demanda de ATP, como os espermatozoides. Diversos estudos revelaram a importância do piruvato nos espermatozoides de garanhões (Gibb et al., 2025; Bruemmert et al., 2002; Martin-Cano et al., 2024); além disso, estudos proteômicos reforçam seu papel no metabolismo dessas células (Martin-Cano et al., 2020; Gaitskill-Phillips et al., 2021; Peña et al., 2024). A principal fonte de piruvato no citosol é a última etapa da glicólise. Outras fontes incluem o lactato, via lactato desidrogenase (LDH), e a alanina, via alanina transferase (ALT), ambas reações reversíveis. No citosol, o piruvato pode seguir diferentes caminhos: ser reduzido a lactato pela

LDH, convertido em alanina pela ALT, ou ser transportado para a matriz mitocondrial via o transportador mitocondrial de piruvato (MPC) para entrar no ciclo de Krebs. O destino citosólico principal do piruvato é sua redução a lactato pela LDH, enzima que catalisa reversivelmente essa reação juntamente com a oxidação de NADH a NAD⁺. Estudos proteômicos mostram que essa enzima é altamente expressa nos espermatozoides de garanhões. Como a glicólise depende de NAD⁺, sua produção de ATP é prejudicada caso os níveis de NAD⁺ caiam e NADH se acumule. Como o NAD⁺ é regenerado na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, falhas mitocondriais podem comprometer a glicólise. Essas falhas são frequentemente observadas durante a conservação de sêmen de garanhões (Garcia et al., 2012; Peña et al., 2015). Outra função interessante do piruvato é sua atuação como eliminador endógeno de peróxido de hidrogênio, superóxido e peroxinitrito (Brand et al., 1997; Varma et al., 2007).

Como discutido anteriormente, o destino da maior parte do piruvato é alcançar a matriz mitocondrial para ser convertido em acetil-CoA e, posteriormente, entrar no ciclo da cadeia de transporte de elétrons. No entanto, no citoplasma, o principal destino do piruvato é ser convertido em lactato pela LDH citosólica. Curiosamente, a presença de uma LDH mitocondrial em espermatozoides de mamíferos é bem conhecida e foi descrita desde a década de 1970 (Hutson et al., 1977; Hutson et al., 1977; Van et al., 1977). A conversão de piruvato em lactato sob condições aeróbicas é bem documentada, inicialmente em células cancerígenas por Otto Warburg (Warburg, 1956) e posteriormente em outras células (Stern et al., 2002; Vander et al., 2009). Um aspecto particularmente interessante no contexto da espermatozoologia equina é o papel recém-descrito do lactato na ativação da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (Cai et al., 2023). Além disso, pesquisas recentes mostram que o lactato pode induzir reações acrossômicas espontâneas quando utilizado como única fonte de energia para espermatozoides de garanhões (Ramirez-Agamez et al., 2024). Estudos iniciais já indicavam o papel importante do metabolismo do piruvato nos espermatozoides de garanhões (Hutson et al., 1977), e diversos trabalhos confirmam seus efeitos positivos (Gibb et al., 2015; Bruemmert et al. 2002). Embora os benefícios fossem atribuídos principalmente ao seu papel como combustível no ciclo de Krebs, resultados recentes indicam que esses efeitos também são fortemente relacionados à ativação da glicólise aeróbica, ou efeito Warburg, nos espermatozoides (Martin-Cano et al., 2024).

Além do complexo metabolismo espermático que possui várias vias de produção de ATP é válido destacar que falhas na espermatogênese podem desregular esses processos. É sabido que a espermatogênese é complexa e sensível. Alterações sistêmicas podem impactar na formação dos espermatozoides nos testículos, trazendo resultados de baixa qualidade seminal e subfertilidade posteriormente.

Apesar disso, existem mecanismos fisiológicos de “seleção” espermática diante da passagem dos espermatozoides pelo epidídimo. No aparelho reprodutor do macho, a existência de um mecanismo ativo de controle da qualidade dos espermatozoides no epidídimo de mamíferos é sugerida pela redução na porcentagem de espermatozoides com defeitos morfológicos entre cabeça e cauda do epidídimo (Baska et al., 2008). Dentre esses métodos de “seleção” está envolvida a ubiquitina.

A ubiquitina é uma proteína de membrana secretada pelo epidídimo que se liga a espermatozoides defeituosos. Ela atua principalmente no epidídimo se ligando covalentemente a agregados proteicos mal formados na superfície dos espermatozoides defeituosos pós-testiculares. Ela é secretada pelas células do epitélio epididimal através de um mecanismo de secreção apócrina envolvendo o deslocamento e a ruptura de bolhas apicais das células epiteliais epididimais, assim o conteúdo proteico é exportado e o sistema ubiquitina-proteassoma (SUP) se incorpora ao fluido epididimário. Então, ao longo da passagem dos espermatozoides pelo epidídimo o SUP atua e as células epiteliais fagocitam os espermatozoides marcados com a ubiquitina e os eliminam, porém, quando há grande quantidade de células marcadas, não é possível a fagocitose de todos os espermatozoides e eles serão pertencentes ao ejaculado (Sutovsky et al., 2001). Portanto, se a produção espermática foi muito falha e existe grande quantidade de espermatozoides marcados com a ubiquitina, o organismo não consegue cumprir essa “seleção” no epidídimo e, consequentemente, o animal ejaculará espermatozoides com defeitos (tanto morfológicos, quanto metabólicos). Lançoni et al. 2022, observou que garanhões que apresentavam baixa qualidade pós descongelação, possuíam alta quantidade de espermatozoides marcados com ubiquitina em seu ejaculado.

As ponderações sobre metabolismo espermático, obtenção de energia pelas células e métodos fisiológicos de seleção espermática são muitas e continuamente descobertas em estudos atuais. Assim, torna-se necessário a atenção a elas como tentativa de evoluir as técnicas de conservação de sêmen.

Estratégias para melhores resultados

No que diz respeito à conservação espermática, os diluidores devem fornecer quantidades adequadas de substratos energéticos, com mínima toxicidade. Além disso, devem oferecer elementos que

contribuam para o correto funcionamento dos mecanismos homeostáticos dessas células. Os diluidores de criopreservação do espermatozoide equino possuem basicamente lipídeos, lipoproteínas, combinações entre gema de ovo e leite desnatado, glicerol, ou a combinação de um ou mais açúcares como crioprotetores. Outros componentes também podem ou não ser incluídos, como o EDTA, (ácido etilenodiaminotetracético), detergentes, tampões para pH e antibióticos (Graham, 1996).

Aitken e colaboradores (2012) afirmaram que uma das descobertas mais importantes dos últimos anos é que um dos maiores causadores dos danos da função espermática é o estresse oxidativo. As ROS possuem grande importância no processo de criopreservação, pois podem ser responsáveis por causar danos às membranas dos espermatozoides, fragmentação de DNA, entre outros fatores, influenciando assim na fertilidade (Lançoni et al. 2018). Diante disto, muitos trabalhos são desenvolvidos com o uso de antioxidantes nos meios de conservação espermática (Affonso et al., 2018; Lançoni et al., 2018; Lançoni et al., 2021), porém os resultados são variáveis e muito dependentes da concentração. Altas quantidades de antioxidantes podem interferir em mecanismos fisiológicos necessários para fecundação, como capacitação espermática e hiperativação. Portanto, dificilmente apenas o uso de antioxidantes vai resolver a problemática da alta variação de resultados de fertilidade com sêmen criopreservado equino. Por isso, é importante avaliar o metabolismo para tentar compreender como a célula poderia produzir energia, com menor quantidade de produção de ROS.

O termo “flexibilidade metabólica” refere-se à capacidade de as células alternarem entre diferentes substratos para a produção de ATP, tal como exemplificado por estudos sobre o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para a diabetes tipo 2 (Sivitz et al., 2010). Em particular, a capacidade das células para mudar para a utilização da glicose é importante em períodos de stress celular, quando a procura de ATP é elevada, mas a disponibilidade de oxigênio é baixa. Isto é bastante pertinente para os espermatozoides de garanhões, que possuem alta demanda de ATP e baixa capacidade de utilização de glicose. Além disso, usam predominantemente FOSOX para suprir suas necessidades energéticas, e são muitas vezes armazenados em ambientes de baixo oxigênio e alto teor de glicose in vitro. Vendo desta maneira, a preservação dos espermatozoides de garanhões pode se basear em intervenções semelhantes às usadas para tratar a diabetes que promovem o fluxo de energia através da via glicolítica (Swegen et al., 2016).

Baseado neste fundamento, Swegen et al., 2016 testaram o uso da droga rosiglitazona no armazenamento de espermatozoides equinos. A rosiglitazona melhora a sensibilidade à insulina e demonstrou restaurar a flexibilidade metabólica e aumentar a captação celular de glicose. A inclusão de rosiglitazona em meio de armazenamento de sêmen à temperatura ambiente manteve a motilidade dos espermatozoides acima de 60% durante 6 dias, atingindo uma motilidade significativamente mais elevada do que a do tratamento controle.

A maior parte do NAD^+ é regenerada na cadeia de transporte de elétrons a partir do NADH. No entanto, disfunções mitocondriais podem comprometer essa oxidação, resultando em queda nos níveis de NAD^+ , prejudicando tanto a glicólise quanto o ciclo de krebs. Isso pode aumentar a produção de compostos tóxicos como glioxal e metilglioxal, que afetam negativamente a função espermática (Ying et al., 2008; Riddle et al., 1973; Ortiz-Rodriguez et al., 2021). Disfunções mitocondriais ocorrem com frequência na conservação de sêmen, devido ao estresse oxidativo e alterações na homeostase de Ca^{2+} (Gibb et al., 2024; Umair et al., 2023) comprometendo a regeneração de NAD^+ mesmo após curtos períodos de armazenamento. Nesse cenário, a indução da glicólise aeróbica representa uma estratégia fisiológica para melhorar a conservação do sêmen de garanhões. Essa via oferece uma fonte alternativa para regeneração de NAD^+ quando a mitocôndria está comprometida, melhorando a eficiência metabólica e prolongando a vida útil dos espermatozoides.

Foi demonstrado que a adição de 10 mM de piruvato melhora a conservação espermática tanto em diluentes com baixa quanto com alta glicose (Becerro-Rey et al., 2024). Com abordagens metabolômicas, confirmou-se que a presença de 10 mM de piruvato aumenta os níveis de lactato e NAD^+ , validando que a glicólise aeróbica é o mecanismo por trás desses efeitos benéficos. Embora mais estudos sejam necessários para elucidar completamente o metabolismo dos espermatozoides de garanhões, intervenções metabólicas já podem ser aplicadas em contextos clínicos.

Considerações finais

Nos últimos anos, tem-se observado um crescente interesse no aprofundamento do conhecimento sobre a biologia dos espermatozoides de garanhões. O avanço na compreensão da fisiologia espermática equina tem proporcionado importantes contribuições para o desenvolvimento de novas biotecnologias reprodutivas. Nesse contexto, o metabolismo espermático tem se consolidado como um campo de estudo,

considerando que desvendar como os espermatozoides equinos administram sua demanda energética, bem como a dinâmica entre o metabolismo celular e a manutenção da homeostase, pode trazer implicações significativas. Esses achados são fundamentais tanto para mitigar os efeitos deletérios decorrentes da conservação seminal quanto para assegurar os ajustes bioenergéticos indispensáveis ao sucesso da fecundação.

Referências

- AL-ESSAWE, E. M., KATILA, T., TAPONEN, J., GILLER, K., KATILA, T.** Improved cryosurvival of stallion spermatozoa after colloid centrifugation is independent of the addition of seminal plasma. *Cryobiology*, 81:145–152, 2018.
- ARNOLD, P. K., FINLEY, L. W. S.** Regulation and function of the mammalian tricarboxylic acid cycle. *J Biol Chem*, 299:102838, 2023.
- BECERRO-REY, L., MARTIN-CANO, F. E., FERRUSOLA, C. O., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H., GAITSKELL-PHILLIPS, G., DA SILVA-ALVAREZ, E., et al.** Aging of stallion spermatozoa stored in vitro is delayed at 22 °C using a 67 mm glucose-10 mm pyruvate-based media. *Androl*, 12:1170–1185, 2024.
- BAUMBER, J., BALL, B. A., GRAVANCE, C. G., MEDINA, V., DAVIES-MOREL, M. C. G.** The effect of reactive oxygen species on equine sperm. *J Androl*, 21(6), 2000.
- BASKA, K. M., ET AL.** Mechanism of extracellular ubiquitination in the mammalian epididymis. *J Cell Physiol*, 215(3):684–696, 2008.
- BRADFORD, L. L., BUHR, M. M.** Function of cryopreserved horse semen is improved by optimized thawing rates. *J Equine Vet Sci*, 22:546–550, 2002.
- BRAND, K. A., HERMFISSE, U.** Aerobic glycolysis by proliferating cells: a protective strategy against reactive oxygen species. *FASEB J*, 11:388–395, 1997.
- BRUEMMERT, J. E., COY, R. C., SQUIRES, E. L., GRAHAM, J. K.** Effect of pyruvate on the function of stallion spermatozoa stored for up to 48 hours. *J Anim Sci*, 80:12–18, 2002.
- BUMANLAG, E., SCARLATA, E., O'FLAHERTY, C.** Peroxiredoxin 6 peroxidase and Ca(2+)-independent phospholipase A(2) activities are essential to support male-mouse fertility. *Antioxidants (Basel)*, 11, 2022.
- CAI, X., NG, C. P., JONES, O., FUNG, T. S., RYU, K. W., LI, D., et al.** Lactate activates the mitochondrial electron transport chain independently of its metabolism. *Mol Cell*, 83:3904–3917.e7, 2023.
- DAVILA, M. P., MUNOZ, P. M., BOLANOS, J. M., STOUT, T. A. E., GADELLA, B. M., TAPIA, J. A., et al.** Mitochondrial ATP is required for the maintenance of membrane integrity in stallion spermatozoa, whereas motility requires both glycolysis and oxidative phosphorylation. *Reproduction*, 152:683–694, 2016.
- FERNANDEZ, M. C., YU, A., MOAWAD, A. R., O'FLAHERTY, C.** Peroxiredoxin 6 regulates the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway to maintain human sperm viability. *Mol Hum Reprod*, 25:787–796, 2019.
- GAITSKELL-PHILLIPS, G., MARTIN-CANO, F. E., ORTIZ-RODRIGUEZ, J. M., SILVA-RODRIGUEZ, A., DA SILVA-ALVAREZ, E., ROJO-DOMINGUEZ, P., et al.** Proteins involved in mitochondrial metabolic functions and fertilization predominate in stallions with better motility. *J Proteomics*, 247:104335, 2021.
- GARCIA, B. M., MORAN, A. M., FERNANDEZ, L. G., FERRUSOLA, C. O., RODRIGUEZ, A. M., BOLANOS, J. M., et al.** The mitochondria of stallion spermatozoa are more sensitive than the plasmalemma to osmotic-induced stress: role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway. *J Androl*, 33:105–113, 2012.
- GIBB, Z., AITKEN, R. J., SHERIDAN, A. R., HOLT, B., WAUGH, S., SWEGEN, A.** The effects of oxidative stress and intracellular calcium on mitochondrial permeability transition pore formation in equine spermatozoa. *FASEB Bioadv*, 6:143–158, 2024.
- GIBB, Z., LAMBOURNE, S. R., AITKEN, R. J.** The paradoxical relationship between stallion fertility and oxidative stress. *Biol Reprod*, 91:77, 2014.
- GIBB, Z., LAMBOURNE, S. R., QUADRELLI, J., SMITH, N. D., AITKEN, R. J.** L-carnitine and pyruvate are pro-survival factors during the storage of stallion spermatozoa at room temperature. *Biol Reprod*, 93:104, 2015.
- HERNANDEZ-AVILES, C., LOVE, C. C., SERAFINI, R., RAMIREZ-AGAMEZ, L., FRIEDRICH, M., GHOSH, S., et al.** Effects of glucose concentration in semen extender and storage temperature on stallion sperm quality following long-term cooled storage. *Theriogenology*, 147:1–9, 2020.

- HERNANDEZ-AVILES, C., RAMIREZ-AGAMEZ, L., LOVE, C. C., FRIEDRICH, M., PEARSON, M., KELLEY, D. E., et al.** The effects of metabolic substrates glucose, pyruvate, and lactate added to a skim milk-based semen extender for cooled storage of stallion sperm. *Theriogenology*, 161:83–97, 2021.
- HUTSON, S. M., VAN DOP, C., LARDY, H. A.** Metabolism of pyruvate and carnitine esters in bovine epididymal sperm mitochondria. *Arch Biochem Biophys*, 181:345–352, 1977.
- HUTSON, S. M., VAN DOP, C., LARDY, H. A.** Mitochondrial metabolism of pyruvate in bovine spermatozoa. *J Biol Chem*, 252:1309–1315, 1977.
- KALAIPOS, M. P.** The tandem of free radicals and methylglyoxal. *Chem Biol Interact*, 171:251–271, 2008.
- KROEMER, G., LOPEZ-OTIN, C., MADEO, F., DE CABO, R.** Carbotoxicity – Noxious effects of carbohydrates. *Cell*, 175:605–614, 2018.
- LANÇONI, R., ET AL.** Melatonin added to cryopreservation extenders improves the mitochondrial membrane potential of postthawed equine sperm. *J Equine Vet Sci*, 69:78–83, 2018.
- LANÇONI, R., ET AL.** Coenzyme Q-10 improves preservation of mitochondrial functionality and actin structure of cryopreserved stallion sperm. *Anim Reprod*, 18:e20200218, 2021.
- LANÇONI, R., ET AL.** Relationship between sperm ubiquitination and equine semen freezability. *Reprod Domest Anim*, 57(5):465–472, 2022.
- LI, J., CAO, F., YIN, H. L., HUANG, Z. J., LIN, Z. T., MAO, N., et al.** Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death Dis*, 11:88, 2020.
- MARTIN-CANO, F. E., GAITSKELL-PHILLIPS, G., BECERRO-REY, L., DA SILVA, E., MASOT, J., REDONDO, E., et al.** Pyruvate enhances stallion sperm function in high glucose media improving overall metabolic efficiency. *Theriogenology*, 215:113–124, 2024.
- MARTIN-CANO, F. E., GAITSKELL-PHILLIPS, G., DA SILVA-ALVAREZ, E., SILVA-RODRIGUEZ, A., CASTILLEJO-RUFO, A., TAPIA, J. A., et al.** The concentration of glucose in the media influences the susceptibility of stallion spermatozoa to ferroptosis. *Reproduction*, 167:e230067, 2024.
- MARTIN-CANO, F. E., GAITSKELL-PHILLIPS, G., ORTIZ-RODRIGUEZ, J. M., SILVA-RODRIGUEZ, A., ROMAN, A., ROJO-DOMINGUEZ, P., et al.** Proteomic profiling of stallion spermatozoa suggests changes in sperm metabolism and compromised redox regulation after cryopreservation. *J Proteomics*, 221:103765, 2020.
- ORTEGA FERRUSOLA, C., GONZALEZ FERNANDEZ, L., SALAZAR SANDOVAL, C., MACIAS GARCIA, B., RODRIGUEZ MARTINEZ, H., TAPIA, J. A., et al.** Inhibition of the mitochondrial permeability transition pore reduces "apoptosis like" changes during cryopreservation of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 74:458–465, 2010.
- ORTIZ-RODRIGUEZ, J. M., MARTIN-CANO, F. E., GAITSKELL-PHILLIPS, G. L., SILVA, A., ORTEGA-FERRUSOLA, C., GIL, M. C., et al.** Low glucose and high pyruvate reduce the production of 2-oxoaldehydes, improving mitochondrial efficiency, redox regulation, and stallion sperm function. *Biol Reprod*, 105:519–532, 2021.
- ORTIZ-RODRIGUEZ, J. M., MARTIN-CANO, F. E., GAITSKELL-PHILLIPS, G., SILVA, A., TAPIA, J. A., GIL, M. C., et al.** The SLC7A11: sperm mitochondrial function and non-canonical glutamate metabolism. *Reproduction*, 160:803–818, 2020.
- PENA, F. J., MARTIN-CANO, F. E., BECERRO-REY, L., ORTEGA-FERRUSOLA, C., GAITSKELL-PHILLIPS, G., DA SILVA-ALVAREZ, E., et al.** Proteomics is advancing the understanding of stallion sperm biology. *Proteomics*, 24:e2300522, 2024.
- PENA, F. J., PLAZA DAVILA, M., BALL, B. A., SQUIRES, E. L., MARTIN MUNOZ, P., ORTEGA FERRUSOLA, C., et al.** The impact of reproductive technologies on stallion mitochondrial function. *Reprod Domest Anim*, 50:529–537, 2015.
- RAMIREZ-AGAMEZ, L., HERNANDEZ-AVILES, C., ORTIZ, I., LOVE, C. C., VARNER, D. D., HINRICHS, K.** Lactate as the sole energy substrate induces spontaneous acrosome reaction in viable stallion spermatozoa. *Androl*, 12:459–471, 2024.
- RIDDLE, V. M., LORENZ, F. W.** Nonenzymic formation of toxic levels of methylglyoxal from glycerol and dihydroxyacetone in Ringer's phosphate suspensions of avian spermatozoa. *Biochem Biophys Res Commun*, 50:27–34, 1973.
- SCARLATA, E., O'FLAHERTY, C.** Antioxidant enzymes and male fertility: lessons from knockout models. *Antioxid Redox Signal*, 32:569–580, 2020.
- STERN, R., SHUSTER, S., NEUDECKER, B. A., FORMBY, B.** Lactate stimulates fibroblast expression of hyaluronan and CD44: the Warburg effect revisited. *Exp Cell Res*, 276:24–31, 2002.
- SUTOVSKY, P., ET AL.** A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. *J Cell Sci*, 114(9):1665–1675, 2001.

-
- SWEGEN, A., CURRY, B. J., GIBB, Z., LAMBOURNE, S. R., SMITH, N. D., AITKEN, R. J.** Investigation of the stallion sperm proteome by mass spectrometry. *Reproduction*, 149:235–244, 2015.
- THORNALLEY, P. J.** The glyoxalase system in health and disease. *Mol Aspects Med*, 14:287–371, 1993.
- UMAIR, M., CLAES, A., BUIJTENDORP, M., CUERVO-ARANGO, J., STOUT, T. A. E., HENNING, H.** In vitro aging of stallion spermatozoa during prolonged storage at 5°C. *Cytometry A*, 103:479–491, 2023.
- VAN DOP, C., HUTSON, S. M., LARDY, H. A.** Pyruvate metabolism in bovine epididymal spermatozoa. *J Biol Chem*, 252:1303–1308, 1977.
- VANDER HEIDEN, M. G., CANTLEY, L. C., THOMPSON, C. B.** Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, 324:1029–1033, 2009.
- VARMA, S. D., HEGDE, K. R.** Lens thiol depletion by peroxynitrite. Protective effect of pyruvate. *Mol Cell Biochem*, 298:199–204, 2007.
- VIDAMENT, M., MAGISTRINI, M., LE FOLL, Y., LEVILLAIN, N., YVON, J. M., DUCHAMP, G., et al.** Temperatures from 4 to 15°C are suitable for preserving the fertilizing capacity of stallion semen stored for 22 h or more in INRA96 extender. *Theriogenology*, 78:297–307, 2012.
- VIDAMENT, M., YVON, J. M., COUTY, I., ARNAUD, G., NGUEKAM-FEUGANG, J., NOUE, P., et al.** Advances in cryopreservation of stallion semen in modified INRA82. *Anim Reprod Sci*, 68:201–218, 2001.
- WARBURG, O.** On the origin of cancer cells. *Science*, 123:309–314, 1956.
- YING, W.** NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. *Antioxid Redox Signal*, 10:179–206, 2008.
- STOREY, B. T.** Mammalian sperm metabolism: oxygen and sugar, friend and foe. *Int J Dev Biol*, 52:427–437, 2008.
- GIBB, Z., LAMBOURNE, S. R., AITKEN, R. J.** The paradoxical relationship between stallion fertility and oxidative stress. *Biol Reprod*, 91:77, 2014.
- PLAZA DAVILA, M., MARTIN MUNOZ, P., TAPIA, J. A., ORTEGA FERRUSOLA, C., BALAO DA SILVA, C. C., PENA, F. J.** Inhibition of mitochondrial complex I leads to decreased motility and membrane integrity related to increased hydrogen and ATP reduced production, while the inhibition of glycolysis has less impact on sperm motility. *PLoS One*, 10:e0138777, 2015.
- TOURMENTE, M., VILLAR-MOYA, P., RIAL, E., ROLDAN, E. R.** Differences in ATP generation via glycolysis and oxidative phosphorylation and relationships with sperm motility in mouse species. *J Biol Chem*, 290:20613–20626, 2015.
- KOPPERS, A. J., DE IULIIS, G. N., FINNIE, J. M., MCLAUGHLIN, E. A., AITKEN, R. J.** Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. *J Clin Endocrinol Metab*, 93:3199–3207, 2008.
- AITKEN, R. J., GIBB, Z., MITCHELL, L. A., LAMBOURNE, S. R., CONNAUGHTON, H. S., DE IULIIS, G. N.** Sperm motility is lost in vitro as a consequence of mitochondrial free radical production and the generation of electrophilic aldehydes but can be significantly rescued by the presence of nucleophilic thiols. *Biol Reprod*, 87:110, 2012.
- PENA, F. J., GARCIA, B. M., SAMPER, J. C., APARICIO, I. M., TAPIA, J. A., FERRUSOLA, C. O.** Dissecting the molecular damage to stallion spermatozoa: the way to improve current cryopreservation protocols? *Theriogenology*, 76:1177–1186, 2011.
- SIVITZ, W. I., YOREK, M. A.** Mitochondrial dysfunction in diabetes: from molecular mechanisms to functional significance and therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*, 12:537–577, 2010.
-