

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS – FISILOGIA ANIMAL
COMPARADA

DESACOPLAMENTO MITOCONDRIAL E ESTRESSE
OXIDATIVO EM ESPERMATOZOIDES SUÍNOS
RESFRIADOS

ESTELA FERNANDES E SILVA

Orientadora: Prof. Dra. Carine Dahl Corcini

Co orientadora: Prof. Dra. Francieli Moro Stefanello

Rio Grande, Março 2014

**DESACOPLAMENTO MITOCONDRIAL E ESTRESSE OXIDATIVO EM
ESPERMATOZOIDES SUÍNOS RESFRIADOS**

ESTELA FERNANDES E SILVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Fisiologia Animal Comparada da Universidade Federal do Rio Grande, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof. Dra. Carine Dahl Corcini

Co orientadora: Prof. Dra. Francieli Moro Stefanello

Rio Grande, Março 2014

AGRADECIMENTOS

A Deus por me manter firme e me auxiliar em cada momento da realização deste trabalho e em todos os outros momentos da vida.

Aos meus pais Volnei e Luisa por toda a dedicação e carinho, por terem ajudado em todos os momentos.

A minha irmã Paula por ter sido crucial para o desenvolvimento dessa pesquisa ajudando desde a confecção de reagentes até a formatação do trabalho.

A minha grande amiga Tainã o meu muito obrigada por ajudar em todos os momentos sem exceção, se dedicando como se fosse seu próprio trabalho e por me ensinar a ser mais perseverante e confiante.

A minha orientadora Carine por todo o apoio, paciência, ensinamentos que tenho certeza me conduzirão por um caminho de sucesso pessoal e profissional.

Ao professor Antonio Sergio muito obrigada por tudo, mas principalmente por tornar possível as análises do citômetro sacrificando suas férias de inverno.

A minha co orientadora Francieli que desde a graduação é um exemplo de profissional e que não mede esforços para me auxiliar.

A amiga Pathise, muito obrigada pelo auxílio nas análises bioquímicas, pela boa vontade e simpatia.

Aos meus avós: Ignácio, Maria e Jozephina, por todas as lições de vida e pela confiança a mim investida e orações.

Ao Amilton Seixas pelo auxílio com a utilização da centrífuga.

Ao meu Tio Sergio pelo auxílio nas questões técnicas de armazenamento de amostras.

A Dra Ligia pelo empréstimo da centrífuga.

A minha madrinha Eulália por conseguir mudar um pouco minha maneira de pensar e me fez ser menos desesperada.

A minha prima Juliana por todo o auxílio nos cálculos de molaridade, por me acompanhar na utilização de alguns equipamentos e pelas palavras de apoio nos momentos de desespero.

A Daiane pelo apoio e orações que foram reconfortantes

A minha amiga Karine que apesar da distância continua sendo uma pessoa especial que contagia com sua calma e bom humor.

Ao meu ex colega e amigo Gustavo pela sua boa vontade no auxílio na utilização dos equipamentos na Biotecnologia.

Aos pesquisadores Ana Kalb e Josencler por todo auxílio em questões técnicas sempre com muito boa vontade.

A minha amiga Thais Figueiredo pelo auxílio incansável nas análises bioquímicas, pela alegria contagiante que diminuiu meu pessimismo.

A minha amiga Stela Gheller por estar sempre disposta a ajudar e ser uma pessoa tão querida com todos.

Aos estagiários e colegas de pós-graduação do grupo de Reprodução Animal Comparada da FURG em especial a estagiária Clarissa Freitas que tem muita disposição e alegria em ajudar.

Ao professor Marcelo Alves Vargas pela orientação no estágio de docência que foi desafiador e contribuiu fundamentalmente para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos professores do grupo de Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Reprodução Animal da Faculdade de veterinária da UFPel por cederem o espaço permitirem a utilização do citômetro de fluxo.

Aos professores do programa de pós graduação em ciências fisiológicas que transmitiram valiosos ensinamentos.

A Associação de Criadores de Suínos do Estado do Rio Grande do Sul pelo envio das doses de sêmen.

Agradeço às técnicas do laboratório de histologia da FURG por auxiliarem na obtenção dos materiais de consumo para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul pela concessão da bolsa de estudos.

Sumário

Resumo Geral	7
Introdução Geral	8
Papéis fisiológicos das espécies reativas e o estresse oxidativo	8
Desacoplamento mitocondrial como estratégia para diminuição do estresse oxidativo: Um fenômeno fisiológico	9
O desacoplamento mitocondrial induzido quimicamente pelo 2,4 dinitrofenol	12
O DNP como um poluente e seus possíveis efeitos nocivos	15
A redução da temperatura e a manutenção dos espermatozoides	16
O uso de diluentes para o resfriamento de sêmen suíno	18
O resfriamento e o estresse oxidativo em espermatozoides.....	18
Espermatozoides suínos e a sensibilidade ao estresse oxidativo	19
As defesas antioxidantes nos espermatozoides.....	20
A espécie suína e suas múltiplas importâncias: Modelo experimental, Xenotransplantação e Produção	21
2,4 dinitrofenol e os espermatozoides suínos	22
Objetivos.....	24
Objetivo geral	24
Objetivos específicos	24
ARTIGO	25
(Submetido para a revista Cryobiology).....	25
2,4 dinitrophenol during cooling of boar semen.....	26
Abstract.....	26
1. Introduction.....	27
2. Methodology.....	29
3. Results.....	33

4. Discussion.....	39
5. Conclusion	42
6. References.....	42
Considerações finais.....	45
Referências Gerais.....	47

Resumo Geral

A espécie suína (*Sus scropha domesticus*) possui relevância nos âmbitos da pesquisa, da xenotransplantação e da produção de carnes. O resfriamento de sêmen é capaz de reduzir o metabolismo celular e possibilitar o armazenamento dos gametas, sendo auxiliar durante práticas de reprodução assistida. Contudo, os espermatozoides suínos são sensíveis ao estresse oxidativo gerado durante o processo de resfriamento. O 2,4 dinitrofenol (DNP) poderia gerar o desacoplamento mitocondrial reduzindo o estresse oxidativo e prolongando indiretamente a viabilidade e capacidade fertilizante de espermatozoides suínos resfriados pela diminuição de espécies reativas de oxigênio. O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do desacoplamento mitocondrial induzido pelo DNP e os efeitos desse desacoplamento sobre as de fluidez e integridade de membrana plasmática, funcionalidade de mitocôndria, motilidade espermática, além dos parâmetros de estresse oxidativo de lipoperoxidação e produção de espécies reativas de oxigênio, durante o resfriamento a 17 °C de 24 até 96 horas. Utilizou-se 22 ejaculados expostos ao diluente *Betsville Thawing Solution* (BTS) (controle) e ao mesmo diluente acrescido das concentrações de 0,01 µM (T1); 0,1 µM (T2); 1,0 µM (T3) e 10 µM (T4) de DNP. Através do teste de Shapiro-Wilk as variáveis que não apresentaram normalidade, tiveram suas médias comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis. As análises estatísticas demonstraram que o DNP não se diferiu do controle independente do tempo de armazenamento, para nenhuma das variáveis analisadas. Possivelmente, a falta de ação sobre as mitocôndrias, ou seja, a não promoção do desacoplamento mitocondrial foi o motivo principal para a falta dos efeitos do DNP. Acredita-se que a utilização do DNP em temperaturas mais elevadas por estas promoverem aumento da fluidez de membrana e/ou o aumento das concentrações de DNP poderiam gerar efeitos significativos sobre as mitocôndrias e demais variáveis analisadas. Finalmente, o DNP nas concentrações testadas não se diferiu do controle em todas as variáveis analisadas independente do tempo de armazenamento.

Introdução Geral

Papéis fisiológicos das espécies reativas e o estresse oxidativo

A produção de energia na forma de adenosina tri fosfato (ATP) na mitocôndria necessita do O_2 como aceptor de elétrons, sendo este reduzido e a água formada. Em uma célula saudável, parte do O_2 é convertido em intermediários reativos, conhecidos como espécies reativas de oxigênio, ao invés de converter-se em água (Fig. 1). Dentre as ERO tem-se o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxil ($\cdot OH$) e peroxinitrito ($ONOO^-$). Tanto o $O_2^{\cdot-}$ quanto o H_2O_2 são formados como subprodutos da conversão de O_2 , mas o radical hidroxil é formado a partir da interação entre o H_2O_2 e íons metálicos como o ferro (RHOADES e PFLANZER, 1996) e o peroxinitrito surge da interação entre óxido nítrico (NO) e O_2 (MORAN et al., 2008). Algumas dessas ERO anteriormente mencionadas podem ser vistas na Fig.1.

As ERO podem danificar ácidos nucleicos, lipídios, proteínas, carboidratos ou qualquer outra molécula próxima, podendo ser consideradas agentes oxidantes (AQARWAL et al., 2005). Sua geração é um pré-requisito essencial para a função normal das células, no entanto, a formação excessiva pode ocasionar o estresse oxidativo e conduzir ao dano celular e patologia associada (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Dentre os papéis fisiológicos das ERO para os espermatozoides, tem-se a necessidade dessas para a hiperativação, capacitação, reação acrossômica e eventos de ligação à zona pelúcida (KODAMA et al., 1996; DE LAMIRANDE et al., 1997; HERRERO et al., 2003). Essas espécies contribuem também para a formação normal dos espermatozoides no que diz respeito à condensação da cromatina, a remodelação da membrana e a ativação de vias de sinalização intracelular (KODAMA et al., 1996; PONS-REJRAJI et al., 2009).

Quando há um equilíbrio entre defesas antioxidantes e ERO, os antioxidantes convertem as ERO em subprodutos seguros para evitar danos. Todavia, quando há desequilíbrio entre a produção de ERO e a detoxificação, pode ocorrer o “estresse oxidativo” que provoca efeitos prejudiciais ao gameta. Dentre os danos ocasionados

sobre os espermatozoides, tem-se alteração da membrana plasmática (FORD, 2004), danos à integridade do DNA (BAUMBER et al., 2003), bloqueio do metabolismo oxidativo (MAKKER et al., 2009), redução da fusão com o oócito (GRIVEAU e Le LANNOU, 1997) e da motilidade e viabilidade dos espermatozoides e a peroxidação lipídica (BUCAK et al., 2007).

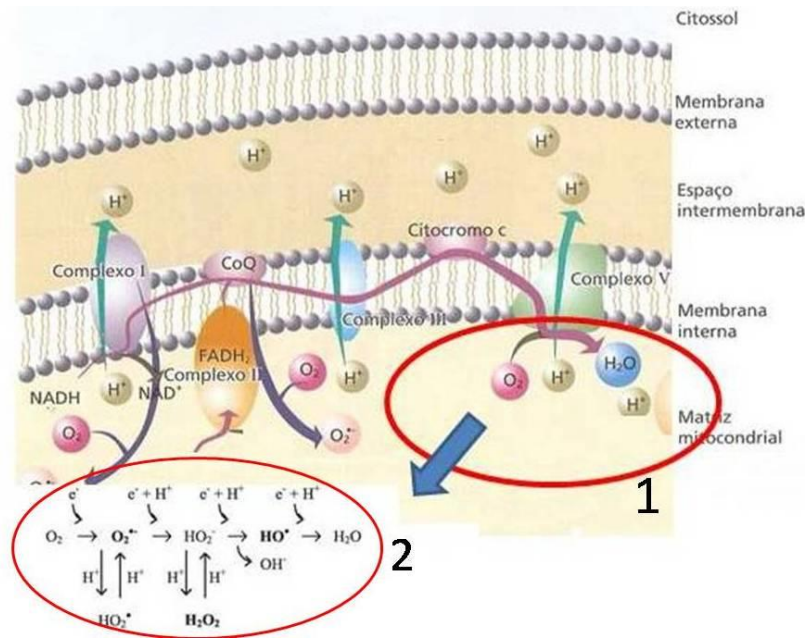


Figura 1: Geração de espécies reativas de oxigênio na mitocôndria. Em 1 tem-se a formação de água, pela redução completa do oxigênio. Em 2 tem-se a redução incompleta do oxigênio gerando espécies reativas de oxigênio. Adaptada dos sites (<http://2.bp.blogspot.com/-82kl4sUiK8/T7r2axWeX9I/AAAAAAAAAAw/Niz99U1BhtY/s1600/cadeia+respirat%C3%B3ria.jpg> e <http://www.scielo.br/img/revistas/qn/v30n1/32e01.gif>)

Desacoplamento mitocondrial como estratégia para diminuição do estresse oxidativo: Um fenômeno fisiológico

O desacoplamento mitocondrial consiste na dissipação do gradiente de prótons formado no espaço intermembranas, pela geração de uma permeabilidade na membrana mitocondrial interna aos íons hidrogênio. Assim, ocorre o desacoplamento entre transporte de elétrons e a síntese de ATP (Fig. 2). Os reflexos celulares do

desacoplamento mitocondrial são basicamente uma menor geração de ATP, bem como uma aceleração da cadeia transportadora de elétrons (CTE), a fim de retomar o gradiente de prótons previamente dissipado (SPEKMAN et al., 2004). Nesse âmbito, o desacoplamento leve e a consequente aceleração da CTE seriam responsáveis pela regulação da produção de ERO mitocondrial, por diminuir a probabilidade de redução incompleta do O₂.

Fisiologicamente, esse fenômeno seria causado por proteínas desacopladoras mitocondriais (UCPs). A UCP1, UCP2, UCP3, UCP4 e UCP5 são membros da família de proteínas carreadoras de íons, que tornam a membrana mitocondrial interna permeável aos íons hidrogênio (BARBIERI et al., 2011) (Fig. 2). Enquanto UCP1 está presente no tecido adiposo marrom e envolvida na termogênese (RICQUIER e BOUILLAUD, 2000), outras UCPs, como a UCP2 (FLEURY et al., 1997), não estão totalmente compreendidas (ARSENIJEVIC et al., 2000). Sabe-se que a UCP2 também realiza o vazamento de prótons e reduz produção de ATP (KRAUSS et al., 2002), e tal atividade é regulada positivamente pelo ânion superóxido (ECHTAY et al., 2002). Desse modo, a função fisiológica dessa proteína pode ser a de reduzir a produção mitocondrial de ERO (ARSENIJEVIC et al., 2000; NEGRE-SALVAYRE et al., 1997) e proteger as células contra o dano oxidativo. Nesse contexto, a super expressão da UCP2 humana em ratos demonstrou a redução de danos cerebrais após o acidente vascular cerebral experimental e traumatismo crânio-encefálico (MATTIASSON et al., 2003), sugerindo a atuação em nível mitocondrial na proteção contra os danos oxidativos.

Alguns estudos sugerem que a ativação de UCP2 e UCP3 por ERO gera um leve desacoplamento para evitar o estresse oxidativo (ECHTAY et al., 2002; BRAND et al., 2004). Nesse âmbito, camundongos *knockout* para genes de algumas UCPs apresentaram níveis elevados de ERO e aumento do dano oxidativo (ARSENIJEVIC et al., 2000; BRAND et al., 2002). Dessa forma, a redução da geração de ERO pode ter reflexos na longevidade de diversas espécies, sendo que a expressão de UCPs exógenas é capaz de prolongar o tempo de vida de moscas adultas (FRIDELL et al., 2004; FRIDELL et al., 2009) e camundongos *knockout* para genes das UCPs apresentam alterações na expectativa de vida vivendo cerca de 10 meses menos que o tipo selvagem, (ANDREWS et al., 2009). Além disso, alguns estudos tem indicam um papel

além daquele relacionado à prevenção do estresse oxidativo, sendo esse o da regulação do metabolismo de ácidos graxos e processos dependentes de ATP (ERLANSON-ALBERTSSON, 2003; SCHRAUWEN et al, 2006).

As UCPs 4 e 5 são altamente expressas no sistema nervoso central, contudo são necessários estudos mais extensos para determinar sua função fisiológica (ECHTAY, 2007).

Quanto ao papel das UCPs em aspectos reprodutivos de machos, evidências indicam que a UCP2 evita a morte celular induzida por ERO em vários tipos de células. Contudo, essa hipótese não é bem compreendida para os testículos. Apesar disso, já foi detectado mRNA para a UCP2 em testículos de rato (LI et al., 2006), bem como a proteína em espermátides alongadas (ZHANG et al., 2007).

No que se refere a suínos, a UCP1 não é expressa nesses animais devido à ausência do tecido adiposo marrom (TRAYHURN et al., 1989). Já a UCP2 e a UCP3 tiveram seu mRNA detectado no músculo esquelético e tecido adiposo em diversos estudos (DAMON et al., 2000; SPURLOCK et al., 2001; RAMSAY et al., 2008). A regulação da produção dessas proteínas possui um controle hormonal tecido específico na espécie. A produção de mRNA da UCP2 é regulada hormonalmente por somatotrofinas no tecido adiposo e fígado, ao passo que o mRNA para a UCP3 é regulado por somatotrofinas apenas no músculo esquelético. O estudo de Ramsay et al., (2008) sugere o papel da UCP2 no tecido adiposo e hepático na regulação de produção de ERO para a espécie suína (BROWN-BORG et al., 2002). Além disso, para a espécie suína a UCP3 pode contribuir para a oxidação de ácidos graxos, por auxiliar no transporte destes do interior da mitocôndria para o citosol (SVENSSON 1998; HUNT et al., 1999; RAMSAY et al., 2008).

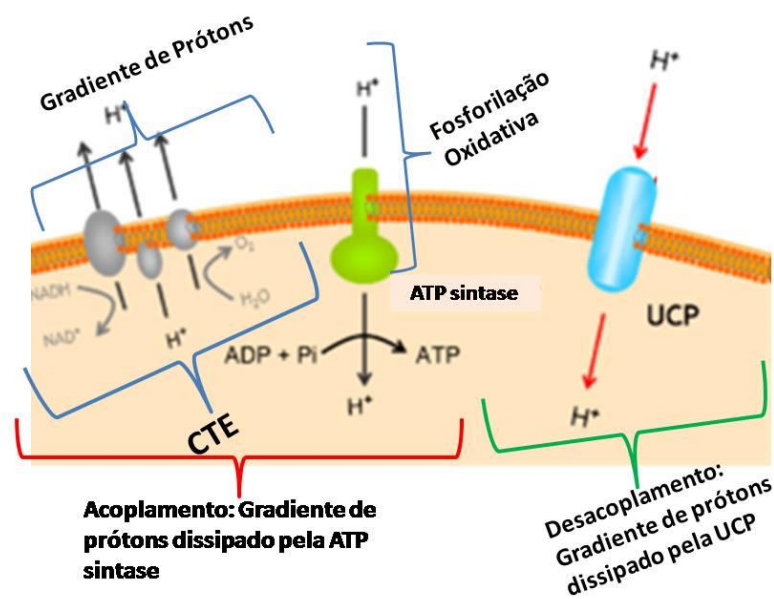


Figura 2: A demonstração do fenômeno de desacoplamento mitocondrial induzido por proteínas desacopladoras mitocondriais (UCP). Adaptada do site (http://2008.igem.org/wiki/images/thumb/1/11/Valencia_UCP.png/400px-Valencia_UCP.png).

O desacoplamento mitocondrial induzido quimicamente pelo 2,4 dinitrofenol

O 2,4 dinitrofenol (DNP) é um composto orgânico nitroderivado que possui a fórmula química $C_6H_4N_2O_5$ e o peso molecular de 184.11 g/mol, se apresenta na forma de cristais amarelos e é ligeiramente solúvel em água (THE MERCK INDEX, 1989; USEPA, 1993) (Fig. 3). O DNP foi patenteado em 1892 e ainda é amplamente utilizado na agricultura e na indústria. Em altas concentrações, o DNP e outros nitrofenóis são tóxicos para os seres humanos e animais, basicamente por interferir no metabolismo celular energético, devido ao desacoplamento da fosforilação oxidativa (DE FELICE e FERRERIRA, 2006).

Seu mecanismo básico de ação consiste na capacidade de se protonar e se desprotonar, atravessando a membrana mitocondrial interna ligado aos íons hidrogênio, dissipando o gradiente de prótons formado no espaço intermembranar e impedindo a formação de ATP (LODISH et al., 1999) (Fig. 4). Ao impedir a formação de ATP, o

gradiente de prótons precisa ser retomado e esse fenômeno é conseguido com a aceleração da CTE que aumenta as taxas de consumo de oxigênio e diminui a probabilidade da redução incompleta desse gás, diminuindo então a probabilidade de formação de ERO (HARPER et al., 2001; DE FELICE e FERREIRA, 2006). O fato de permitir que a CTE prossiga, sem a produção de ATP, aumenta as taxas basais do metabolismo. Por esse motivo, nos anos de 1930, o DNP foi utilizado extensivamente como uma droga para o emagrecimento e tratamento da obesidade (PARASCANDOLA, 1974). Porém, em 1938 o uso de DNP como uma droga para consumo humano foi proibido nos Estados Unidos da América, pela *Food and Drug Administration*, devido ao número de mortes e desenvolvimento de cataratas, entre alguns pacientes (PARASCANDOLA, 1974). Nesse contexto, inúmeras pesquisas relatam que a exposição sistêmica a altas doses de DNP tem efeitos secundários graves levando à morte de humanos e outros animais (HARRIS e COCORAN, 1995). Apesar da proibição do uso do DNP, recentemente pesquisas *in vitro* e *in vivo* revelaram possíveis efeitos benéficos do DNP em baixas concentrações. Esses efeitos benéficos seriam basicamente os de prevenção da degeneração neuronal induzida por diferentes injúrias, gerando a possibilidade de utilização em terapias para a doença de Alzheimer e outras doenças neurodegenerativas (WASILEWSKA-SAMPAIO et al., 2005). Os efeitos benéficos de baixas concentrações de DNP estariam relacionados a sua capacidade de desacoplamento da respiração mitocondrial, que diminui o gradiente de prótons acelerando a CTE, diminuindo assim a formação de ERO (BRAND, 2000; KORDE et al., 2005a).

Nesse contexto, a administração intraperitoneal de DNP em ratos mostrou proteção significativa contra a lesão cerebral (MARAGOS et al., 2003). Outro estudo, também pela administração intraperitoneal de DNP em ratos, demonstrou a redução do volume de infarto em cerca de 40% em um modelo de isquemia-reperfusão no cérebro (KORDE et al., 2005b). Considerados em conjunto, esses estudos sugerem que, contrariamente ao desacoplamento mitocondrial deletério que ocorre na presença de altas concentrações de DNP, o desacoplamento leve induzido por baixas doses de DNP podem realmente ser benéfico em termos de redução de danos neuronais oxidativo em diferentes condições patológicas. Um grande número de provas indica que o

envelhecimento é, pelo menos em parte, ligado a alterações no metabolismo mitocondrial e formação de espécies reativas ERO. É interessante observar que a administração de DNP foi capaz de prolongar a vida útil de ambos *Drosophila melanogaster* e *Saccharomyces cerevisiae* (BARROS et al., 2004; PADALCO, 2005).

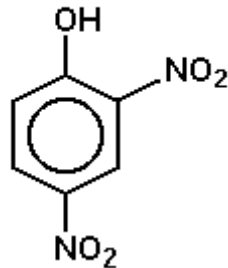


Figura 3: Representação da estrutura química do 2,4 dinitrofenol. Adaptada do site (http://www.klickeducacao.com.br/2006/arq_img_upload/simulado/11809/qui.bmp)

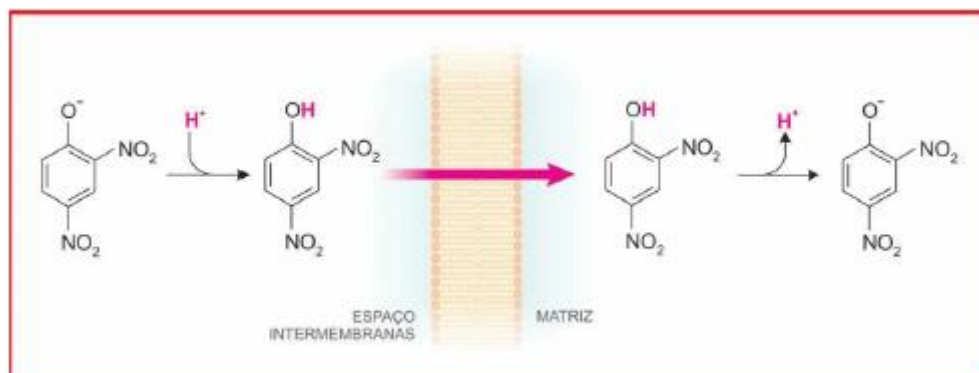


Figura 4: Mecanismo de ação do DNP: O composto se protona no espaço intermembranas e de desprotona na matriz mitocondrial dissipando o gradiente de prótons. Retirada do site (<http://bizuando.com/material-apoio/bioq/13-CadeiadeTransporteefosforilacao.pdf>)

O DNP como um poluente e seus possíveis efeitos nocivos

Sabe-se que o DNP em baixas doses gera um desacoplamento suave e é capaz de ser neuroprotetor, principalmente por diminuir o estresse oxidativo (WASILEWSKA-SAMPAIO et al., 2005). Contudo, a utilização desse composto na agricultura (como pesticida), na indústria de tintas e metais (VOLKOV et al., 1998; WHITACRE E WARE, 2004), além de sua liberação do escape de automóveis (NOJIMA et al., 1983) é preocupante.

Assim, seres humanos e outros animais podem ser expostos ao DNP principalmente através de águas residuais, rios, águas subterrâneas, solo e atmosfera (LEUENBERGER et al., 1988). A exposição a concentrações elevadas dessa substância pode gerar um desacoplamento grave levando a prejuízos sistêmicos e muitas vezes à morte (MWESIGWA et al., 2000). As doses de DNP que podem causar danos sistêmicos e/ou levar à morte são bastante variáveis entre as espécies e podem variar entre os indivíduos em função do peso, sexo e idade, e por isso não serão mencionadas (SHEA et al., 1983; MWESIGWA et al., 2000; TAKAHASHI et al., 2009).

O efeito mais mencionado do DNP seria a hipertermina, mas este também é capaz de comprometer as funções hepática, muscular, oftalmológica, e reprodutiva. Em nível hepático para seres humanos, o efeito do DNP geraria uma ligeira elevação de enzimas, como a creatina quinase. Para cães e gatos tem-se relatos de aumento da secreção da bile, ao passo que para o rato essa secreção da bile é diminuída pelo DNP (BIZARD et al., 1960; PUGH & STONE, 1968; BOYER, 1971; SLATER & DELANEY, 1971; RUTISHAUSER & STONE, 1975; van VEENENDAAL et al., 2011). Os reflexos sobre as funções musculares seriam a ação sobre a membrana do músculo liso vascular na tência coli da cobaia (*Cavia aperea*). Doses de 1.10^{-4} molar reduzem o ATP e inibem a atividade contrátil na cobaia (BORN, 1955), ao passo que doses mais elevadas (5.10^{-4} molar) de DNP tem efeitos sobre a permeabilidade iônica da membrana da célula. No músculo esquelético do sapo, Koketsu et al. (1964) indicaram que uma rápida despolarização inicial causada pela DNP foi estreitamente relacionada com um aumento na concentração intracelular Cl^- (HORN E KUMAMOTO, 1970).

No que se refere a danos oftalmológicos, o DNP foi capaz de gerar cataratas em cães, ratos, coelhos, cobaias, patos e seres humanos, sendo que as doses cataratogênicas variam entre as espécies sendo para humanos cerca de 0,3 g durante alguns meses, ao passo que 15 mg/kg durante 6 dias para coelhos com 2 dias de vida já é suficiente para gerar a catarata (GEHRING E BUERGE, 1969). Os efeitos reprodutivos mencionados em ratos por Takahashi et al., (2009) demonstram que doses de 30 mg/kg de peso corporal por dia (durante cerca de 46 dias) em ratos reduziu significativamente o número de filhotes vivos no pós-natal, o índice de nascidos vivos e o peso corporal dos nascidos vivos. Contudo, não houve aumento da incidência de malformações nos grupos tratados com DNP, logo esse se apresenta nocivo ao desenvolvimento apesar de não ser teratogênico. Mesmo não existindo relatos específicos para os efeitos do DNP em suínos, possivelmente os efeitos seriam bastante semelhantes àqueles em humanos devido à semelhança anatômica e fisiológica entre essas espécies (DANTZER, 1986; HUGHES, 1986; KERRIGAN et al., 1986). Apesar de todos os danos faz-se necessário ressaltar que o composto só é danoso em altas concentrações.

A redução da temperatura e a manutenção dos espermatozoides

O aumento da temperatura, medida dos movimentos moleculares induzidos termicamente, aumenta o grau de agitação das moléculas, ao passo que quando essa temperatura diminui a agitação molecular também é diminuída. Logo, a temperatura é um fenômeno que exerce efeitos relevantes em reações físicas, químicas e bioquímicas (WHITERS, 1992), sendo capaz de atuar sobre as ligações fracas intra e intermoleculares, alterando, por exemplo, ligações tipo enzima-substrato, o que afeta a velocidade das reações enzimáticas facilitando-as ou dificultando-as (HOCHACHKA e SOMERO, 2002). Além disso, a temperatura tem capacidade de modificar a permeabilidade das membranas biológicas por interferir na atividade de proteínas envolvidas com o fenômeno de transporte de solutos e solventes (HAZEL, 1984).

Os reflexos da temperatura sobre o metabolismo celular por dificultar ou facilitar as atividades enzimáticas, torna-a um fenômeno passível de utilização para prolongar a sobrevivência celular. Nesse sentido, a conservação a baixas temperaturas

pode assegurar, de certa forma, a continuidade e expansão de pesquisas por superar barreiras cronológicas e geográficas (COSTA E FERREIRA, 1991).

A redução da temperatura é um método amplamente utilizado para a conservação de espermatozoides de diversas espécies (ALMOND et al., 1994; HAMMERSTEDT et al., 1990; FOOTE e PARKS, 1993; MAXWELL e SALAMON, 1993). Existem duas formas principais de reduzir a temperatura e desse modo conservar células espermáticas: uma delas seria através do resfriamento e outra através do congelamento (VISHWANATH et al., 1996).

No resfriamento a fertilidade espermática pode ser mantida de 3 a 5 dias, quando armazenado a temperaturas entre 10 e 21 °C. Contudo, após o período de 3 a 5 dias, a capacidade fertilizante dos gametas reduz de forma constante, a uma taxa de cerca de 3 a 6 % por dia (YOSHIDA, 2000). O congelamento, geralmente em nitrogênio líquido (-196 °C), possibilita uma manutenção por vários anos dos espermatozoides, por reduzir de modo muito significativo o metabolismo celular (YOSHIDA, 2000), sendo utilizado em diversas espécies, incluindo os seres humanos. Contudo, para a espécie suína o congelamento gera grande mortalidade dos gametas e prejuízos estruturais e funcionais dos gametas remanescentes do processo, reduzindo as taxas de prenhez e número de leitões nascidos (YOSHIDA, 2000).

Nesse âmbito, a faixa ideal de temperatura para a manutenção das doses inseminantes para a espécie suína situa-se entre 15 e 18 °C, devido à sensibilidade à redução de temperatura. Temperaturas inferiores a 15 °C normalmente causam o fenômeno de choque térmico, que acarreta a perda irreversível da motilidade espermática, além de lesões estruturais (WATSON, 1996; SCHEID, 2003). Esta sensibilidade deve-se, basicamente, à perda da permeabilidade seletiva e da integridade da membrana plasmática do espermatozoide. Temperaturas acima dos 18 °C, não são convenientes, pois não reduzem significativamente o metabolismo celular, além de favorecer o crescimento bacteriano (WATSON, 1996; SCHEID, 2003).

O uso de diluentes para o resfriamento de sêmen suíno

Os diluentes são substâncias que devem assegurar uma fonte de energia, além de proporcionarem um pH e uma pressão osmótica adequados para a célula espermática, reduzindo o choque térmico e inibindo o crescimento bacteriano. Os componentes básicos de um diluente são açúcares, proteínas, lipoproteínas e soluções tampões (KARABINUS et al., 1997).

Existe uma gama de diluentes utilizados para o resfriamento de sêmen na espécie suína. Esses diluentes estão classificados conforme a capacidade de manutenção da viabilidade espermática em função do tempo. Como diluentes de longa-duração (5 a 7 dias) pode-se citar o *Androhep* e *Zorlesco*, e como exemplo daqueles de curta duração (cerca de 3 dias) o *Beltsville Thawing Solution* (BTS) (PURSEL e JOHNSON, 1975) e o KIEV (PLISKO, 1965). Um dos diluentes mais utilizados é o BTS, que, na proporção de 1:1 na refrigeração a 15 °C é capaz de conservar a capacidade fertilizante do sêmen por até 5 dias após a coleta (MURGAS et al., 2002). O BTS, primeiramente desenvolvido para o sêmen congelado na forma de *pellet*, foi adaptado para a utilização no resfriamento (PURSEL E JOHNSON, 1975; JOHNSON et al., 1988). Esse diluente contém glicose como fonte energética, bicarbonato para manutenção do pH, baixas concentrações de potássio, além de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) que captura íons divalentes, especialmente o Ca^{2+} , para evitar a capacitação espermática durante o armazenamento (JOHNSON et al., 2000).

O resfriamento e o estresse oxidativo em espermatozoides

A redução da temperatura acarreta na desaceleração das reações enzimáticas, contudo o metabolismo celular continua a ocorrer, porém mais lentamente (HOCHACHKA e SOMERO, 2002). Desse modo, os espermatozoides, como todas as células vivas em condições aeróbias, enfrentam constantemente o paradoxo do oxigênio (O_2), ou seja, a necessidade do O_2 para suportar vida, como acceptor final de elétrons na cadeia transportadora de elétrons, junto ao problema da geração de seus metabólitos

(gerados pela redução incompleta), como as espécies reativas de oxigênio (ERO) (ORZOŁEK et al., 2013).

Nesse contexto, o estresse oxidativo, caracterizado por um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e as defesas antioxidantes, é largamente relatado durante o resfriamento de sêmen estando relacionado à perda da capacidade fertilizante do gameta (CHATTERJEE E GAGNON, 2001; FUNAHASHI e SANO, 2005; MARTÍN-HIDALGO et al., 2011; ORZOŁEK et al., 2013). Esse desequilíbrio dá-se, não necessariamente, pelo aumento da produção de ERO, pois durante o resfriamento as reações enzimáticas que controlam o metabolismo estão mais lentas (HOCHACHKA e SOMERO, 2002), mas sim pelas baixas defesas antioxidantes do gameta (HU et al., 2009). Assim, mesmo uma produção baixa de ERO em temperaturas reduzidas pode ocorrer danos espermáticos devido à carência antioxidante (HOCHACHKA e SOMERO, 2002; HU et al., 2009).

Embora as pequenas variações na concentração dessas ERO desempenhem um papel na sinalização intracelular (DROGE, 2002), um aumento descontrolado pode induzir a peroxidação lipídica, diminuir motilidade e gerar danos a proteínas e ao DNA (LEON et al., 2004). As ERO podem modificar as funções celulares, pois oxidam estruturas celulares importantes como as membranas (DE LAMIRANDE e GAGNON, 1995; SALEH e AGARWAL, 2002), e desta forma a célula necessita evitar o estresse oxidativo por este ser capaz de gerar a morte celular do gameta e a consequente infertilidade (AGARWAL et al., 2003).

Espermatozoides suínos e a sensibilidade ao estresse oxidativo

O sêmen suíno torna-se facilmente danificado pelo excesso de ERO durante o resfriamento. Esse fato deve-se a presença de um elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) nos fosfolípidos da membrana, como o docosapentaenóico (DPA) e o docosahexaenóico (DHA) que diminuem devido à peroxidação lipídica (CEROLINI et al., 2001), bem como a um baixo nível na proporção colesterol: fosfolípidos de membrana (JOHNSON et al., 1969; PARKS et al., 1992). Ainda, o plasma seminal da

espécie possui uma atividade antioxidante baixa que pode favorecer os danos oxidativos mesmo *in vivo* (BREZEZINSKA-SLEBODZINSKA et al., 1995).

As defesas antioxidantes nos espermatozoides

Os agentes antioxidantes visam manter o equilíbrio entre a produção e a detoxificação de ERO. Essas defesas são baixas nos gametas, principalmente de mamíferos, os quais descartam a maior parte do citoplasma durante a fase terminal de diferenciação, lhes faltando um componente citoplasmático que pode significativamente neutralizar os efeitos nocivos das ERO (HU et al., 2009). Assim, outra alternativa de defesa antioxidante seria o plasma seminal, o qual é dotado de uma bateria de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx), glutaciona redutase (GR) e glutaciona S-transferase (GST) (ALVAREZ et al., 1987; BECONI et al., 1993; MARTI et al., 2007; STREZEZEK et al., 2009). A enzima SOD dismuta o ânion superóxido e converte-o em H_2O_2 e O_2 . O H_2O_2 a partir desta reação é, por sua vez eliminado pela CAT e GPX (BATHGATE et al., 2011). Além disso, o plasma seminal está equipado com diversos antioxidantes não enzimáticos, tais como a glutaciona (GSH), L-ergotioneína (ERT), ascorbato, urato, alfa-tocoferol, piruvato, taurina e hipotaurina (STOREY, 1997; STREZEZEK et al., 1999). A GSH é o principal mecanismo pelo qual as células se protegem contra o $\cdot OH$, pois esta doa um elétron e, portanto, estabiliza e, posteriormente, neutraliza as ERO (BATHGATE et al., 2011). A vitamina E (alfa tocoferol) pode quebrar as ligações covalentes que se formaram entre as ERO e as cadeias laterais de ácidos graxos presentes na membrana (BREZEZINSKA-SLEBODZINSKA et al., 1995). Mesmo sendo o plasma seminal um fluido dotado de defesas antioxidantes, os suínos possuem baixos níveis de enzimas antioxidantes nesse fluido (STREZEZEK, 1999).

A espécie suína e suas múltiplas importâncias: Modelo experimental, Xenotransplantação e Produção

O suíno doméstico (*Sus scropha domesticus*), bem como o miniatura (minipig), obtido por cruzamentos sucessivos que geraram um animal com dimensões reduzidas, são utilizados amplamente como modelos de experimentação. A utilidade desses animais deve-se ao fato de possuírem semelhanças anatômicas e fisiológicas com a espécie humana, especialmente aquelas relacionadas à pele, esqueleto, articulações, dentes, trato gastrointestinal, pâncreas, fígado, rins, coração, vasos sanguíneos, pulmão, mecanismo imune e estágio fisiológico de recém-nascidos (DANTZER, 1986; HUGHES, 1986; KERRIGAN et al., 1986). As raças tradicionais de suínos apresentam a limitação do grande porte devido à enorme capacidade de conversão alimentar, sendo mais largamente utilizados para ensaios agudos ou com no máximo um mês de duração (SWINDLE et al., 1994). Por outro lado, os suínos miniaturas são empregados em experimentos de longa duração devido ao seu pequeno tamanho e peso (atingem de 45-100 kg quando adultos) (KURIHARA-BEGSTROM et al., 1986; WHITE et al., 1986; SWINDLE et al., 1994).

Além de serem modelos experimentais, os suínos destacam-se como fontes para órgãos na xenotransplantação (transplante de células, tecidos ou órgãos de uma espécie para outra) (KIRK, 2003). Esses animais praticamente substituíram a utilização de cães e macacos como possíveis doadores de órgãos para humanos. Isso ocorreu devido a uma maior aceitação social, uma vez que é uma espécie utilizada para obtenção de carne para o consumo humano, gerando menos conflitos éticos (KIRK, 2003). As características como o tamanho e os ciclos curtos de reprodução, tornam os suínos animais adequados para inúmeras técnicas cirúrgicas que exigem dimensões de um ser humano (SWINDLE e SMITH, 1998; PARK et al., 1976).

O xenotransplante utilizando órgãos de suínos poderia resolver a crescente escassez de doadores de órgãos para alotransplantação (transplante entre indivíduos geneticamente diferentes, porém da mesma espécie) (EKSER et al., 2009).

Alguns estudos de transplante entre suínos e primatas não humanos demonstram resultados promissores. Nas duas últimas décadas, grandes progressos ocorreram na

área da xenoinmunobiologia no que diz respeito ao transplante entre suínos e primatas não humanos, possibilitando uma compreensão mais aprofundada da rejeição de órgãos pós-transplante (EKSER et al., 2009). O aperfeiçoamento da tolerância pós-transplante parece depender da manipulação genética dos suínos, gerando transgênicos.

Neste sentido, resultados relevantes foram obtidos com modificações genéticas como, por exemplo, o *knockout* do gene para a α 1,3-galacossiltransferase (uma glicoproteína de membrana das células suínas, grande responsável pela rejeição hiperaguda, quando atacada por anticorpos anti- α Gal) associadas a imunossupressores (ZAIDI et al., 1998; DIAMOND et al., 2001; NIEMANN et al., 2001). Após manipulações genéticas obteve-se a sobrevivência pós-transplante de coração, cerca de 4 meses de primatas não humanos (KUWAKI et al., 2005; KNOSALLA et al., 2002; HOUSER et al., 2004). Além disso, uma sobrevivência de até três meses foi alcançada em transplante de rim (COZZI et al., 2000). Por outro lado, órgãos como o fígado e pulmões não demonstraram sucesso após a transplantação, gerando um tempo reduzido de sobrevivência. Finalmente, o desenvolvimento de novos fármacos imunossupressores é fundamental, contudo parece mais provável que a modificação genética suína seja mais determinante (COOPER et al., 1993; SANDRIN et al., 1995).

Além da importância no âmbito da pesquisa e xenotransplantação, a espécie presta-se como fonte de proteína animal. Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) (2010) a suinocultura representa 36% do mercado mundial na produção de carnes reforçando a importância da espécie em nível mundial. Em convenção sobre “Diversidade Biológica”, a FAO afirmou que os recursos genéticos para a alimentação e a agricultura, como o germoplasma de suínos, são a base biológica da segurança alimentar mundial (FAO, 1993).

2,4 dinitrofenol e os espermatozoides suínos

É amplamente relatada a sensibilidade dos espermatozoides suínos ao excesso de ERO, caracterizando o estresse oxidativo. Essa sensibilidade deve-se a características particulares do gameta como a composição dos fosfolípidos de membrana (CEROLINI

et al., 2001). Esse estresse oxidativo pode ocorrer *in vivo*, contudo é intensificado durante o resfriamento de sêmen entre 15-18 °C, pois esta faixa de temperatura mantém o processo de fosforilação oxidativa e promove a geração excessiva de espécies reativas de oxigênio (HOCHACHAKA E SOMERO, 2002; ORZOLEK et al., 2013).

Nesse contexto, o 2,4 dinitrofenol (DNP), em baixas doses, através do fenômeno de desacoplamento mitocondrial leve poderia diminuir a formação de ERO e aumentar a sobrevivência e a capacidade fertilizante de espermatozoides suínos armazenados. O DNP se mostrou benéfico, aumentando a motilidade de espermatozoides de macaco pós-descongelamento em concentrações baixas (de no máximo 50µM) (DONG et al., 2010). Além disso, o composto aplicado em mórulas suínas obteve maior número de blastocistos em relação ao controle na concentração de 100 µM, demonstrando a possível relevância do composto para a espécie suína (MACHÁTY et al., 2001). Contudo, não existem relatos da utilização do DNP para o resfriamento de espermatozoides suínos, sendo um objeto de pesquisa interessante.

Objetivos

Objetivo geral

Determinar os efeitos do 2,4 dinitrofenol sobre a motilidade de espermatozoides suínos, além dos efeitos sobre organelas e parâmetros relacionados ao estresse oxidativo.

Objetivos específicos

- Determinar a motilidade, integridade e fluidez de membrana plasmática, funcionalidade de mitocôndria, produção de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica de espermatozoides suínos antes do resfriamento e tratamento com DNP
- Determinar os efeitos do 2,4 dinitrofenol sobre espermatozoides suínos armazenados a 17 °C no período de 24 a 96 horas através das seguintes avaliações:
 - ✓ Integridade de membrana plasmática
 - ✓ Funcionalidade de mitocôndria
 - ✓ Fluidez de membrana plasmática
 - ✓ Produção de espécies reativas de oxigênio
 - ✓ Índice de lipoperoxidação através de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

ARTIGO

(Submetido para a revista Cryobiology)

2,4 dinitrophenol during cooling of boar semen

Estela Fernandes Silva^a, Antonio Sergio Varela Junior^b, Tainã Figueiredo Cardoso^a, Francieli Moro Stefanello^c, Ana Cristina Kalb^d, Pablo Elías Martínez^d, Carine Dahl Corcini^{e*}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas: Fisiologia Animal Comparada, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brasil
*star.fs@hotmail.com; tainaacardoso@hotmail.com.

^b RAC, Reprodução Animal Comparada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brasil, antoniovarela@furg.com.

^c Centro de Ciências Químicas Farmacêuticas e de Alimentos, Campus Capão do Leão, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil, fmstefanello@gmail.com.

^d Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio grande, RS, Brasil, anacrisk@gmail.com;
pabloeliasm@gmail.com.

^e ReproPel, Faculdade de Veterinária, Campus Capão do Leão, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil, *corresponding author: Carine D. Corcini
Universidade Federal de Pelotas - Faculdade de Veterinária, Campus Universitário s/n, Caixa Postal 354 Campus Universitário s/n, Caixa Postal 354 Pelotas, Rio Grande do Sul 96001970, Brasil. Tel/Fax: +55 (53) 32759161; corcinicd@gmail.com.

Abstract

The swine spermatozoa are sensitive to oxidative stress generated during the cooling process. 2, 4 dinitrophenol (DNP) could generate mitochondrial uncoupling, reducing oxidative stress and thus, acting indirectly prolonging the viability and the fertilizing capacity of swine spermatozoa cooled. The aim of this study was to evaluate the effects of uncoupling mitochondrial induced by DNP and the effects of this uncoupling on the variables of fluidity and integrity of plasma membrane, mitochondrial functionality, sperm motility, beyond of oxidative stress parameters of lipid peroxidation and production of reactive oxygen species, in swine spermatozoa during cooling to 17°C from 24 up 96 hours. Was used 22 ejaculates exposed to extender Betsville Thawing Solution (BTS) (control) and at the same diluent increased concentrations of 0.01 mM (T1), 0.1 mM (T2), 1.0 mM (T3) and 10 mM (T4) of DNP. The Shapiro Wilk test indicated absence of normality, soon means were compared by the Kruskal - Wallis test. Statistical analysis showed that DNP does not differ from the control independent of storage time, for any of the variables. Possibly, the lack of action on the mitochondria, in other words, the inability to dissipate the proton gradient generated the inability of DNP to reflect on the remaining variables. It is believed that the DNP could produce significant effects if used in higher temperatures, due to increased membrane fluidity and/or the use of higher concentrations. Finally, the DNP in concentrations tested did not differ from control for all variables independent of storage time.

Keywords: mitochondrial uncoupler, oxidative stress, fertilizing capacity.

1. Introduction

The metabolism of a cell somatic or reproductive as the spermatozoa is controlled by enzymes, proteins with catalytic activity to convert a substrate into a product [1]. The enzyme reaction speed is controlled by many factors among which the temperature and pH [2]. The temperature reduction can slow down cell metabolism [3] and thereby increase the survival time of cells. The cooling of boar semen between 15 ° C and 17 ° C decreases the metabolic activity, the microbial growth and increases the survival time of swine spermatozoa up to certain limits, because from 72h begin to occur cell death and consequently loss of fertilizer capacity more significantly [4, 5].

One of the factors that determine the storage limit is related to oxidative stress, not exactly due to excessive increase in reactive oxygen species (ROS), because the metabolism is slowed due to low temperatures [2, 3], but due to the characteristic of swine spermatozoa cells which have low antioxidant defenses are insufficient to neutralize ROS, even if these are being produced at a low rate due to low temperatures [6, 7].

Thus, despite the cooling extend spermatozoa survival the oxidative stress associated to process compromises the fertilizing ability of gamete because the ROS oxidize cellular structures such as membranes [8]. Especially the membranes are easily damaged due to the high content of polyunsaturated fatty acids in phospholipids of membrane (30%docosohexanoico and 25% of docosapentanoic) [9] as well as a low level in the ratio cholesterol: phospholipid membrane of swine spermatozoa [10].

An alternative to reduce oxidative stress would promote changes in mitochondrial functions, because these organelles are the major site of ROS production [11]. It is known that 2, 4 - dinitrophenol (DNP) is a mitochondrial uncoupler that dissipates the proton gradient generated in the intermembranas space of mitochondria, it preventing the synthesis of adenosine triphosphate (ATP). This results in an increase in electron transport and in the rates of oxygen consumption, decreasing the probability of incomplete reduction of oxygen and consequently decreasing the generation of ROS [12]. The DNP has an action that is in part controversial because high concentrations of DNP would be able to reduce significantly the production of ATP, however low concentrations generate a mild uncoupling, and the cell would be able to resume the proton gradient by accelerating electron transport chain, which would decrease the production of ROS mitochondrial [13].

The fertilizing capacity of spermatozoa is a complex trait that needs the performance and integrity of numerous organelles [14]. Thus, it is interesting to evaluate the gametes exposed to DNP, monitoring the integrity of some important spermatozoa organelles as the plasma membrane and mitochondria. The study of the influence of DNP on the cooling of boar semen is nonexistent. Nevertheless, Dong et al., (2010) [15] demonstrated the beneficial effects of uncoupler on motility of post-thaw spermatozoa monkey, underscoring the fact that the mild uncoupling can increase sperm survival by decreasing oxidative stress.

Due to anatomical and physiological similarities to human species (*Homo sapiens*), the swine (*Sus scropha domesticus*) species has utility as a biological model. Moreover, the species is a promising source of organs in human xenotransplantation,

because is even more advantageous than non-human primates, due to a lower risk for the transmission of zoonoses [16]. Another swine importance would be his contribution as a source of animal protein [17]. Therefore, the cooling of semen can contribute in assisted reproduction programs that help the research, through the maintenance of experimental animals [18], beyond to help the industry, when used in commercial farms [19].

The aim of this study was to determine the effects of 2,4 dinitrophenol on spermatozoa motility of pigs, beyond the effects on organelles and parameters related to oxidative stress during cooling for up 96 hours, at 17 ° C.

2. Methodology

2.1. Animals and semen collection

The experiment used only biological material from animals, did not require approval by the Ethics Committee, thus sufficed send a notification to the Ethics Committee on Animal Use (CEUA) of the Federal University of Rio Grande. Were used 11 different males of Landrace and Large White breed, totaling 22 ejaculates. Males were housed in individual pens in a central commercial of artificial insemination (longitude 51 ° 57'59 " and latitude 29 ° 30 '07 ") and were collected by the gloved - hand method. Immediately after collection semen was diluted 1:1 (v / v) in Beltsville Thawing Solution - BTS [20], for sending to the Laboratory of Animal Reproduction of the Faculty of Veterinary Medicine of the Federal University of Pelotas under refrigeration (17°C). Were used only samples that had at least 70 % motility after arrival at the laboratory.

2.3. Cooling

The control and treatments containing DNP had a concentration of $5 \cdot 10^7$ sperm / mL which were obtained after the following procedures: 15ml of semen was centrifuged at 800g for 10 minutes, a procedure performed in duplicate. The supernatant was discarded and the *pellet* containing the cells resuspended in BTS. Was added to the control BTS and the other treatments BTS plus DNP at final concentrations of: T1= 0.01 μ M; T2= 0.1 μ M; T3= 1 mM; T4=10 μ M. After these procedures, the semen was stored in cooler with temperature controlled at 17 ° C and the semen evaluated from 24 up 96 hours. All chemical reagents used in this experiment were purchased from Sigma Aldrich (Saint Louis, MO).

2.4. Sperm evaluations performed pre-cooling and during cooling (from 24 up 96 hours)

2.4.1. Motility

The motility was evaluated with an optical microscope, under slide and coverslip both pre heated to 37 ° C [21, 22]. The samples were previously kept in water bath 37 ° C for 15 minutes.

2.4.2. Analysis by flow cytometric

For flow cytometry was used Attune Acoustic Focusing Cytometer ® (Applied Biosystems) with blue (488 nm) and violet (405 nm) lasers. Were analyzed the results using the program Attune Cytometric Software v 2.1. For detection of cell populations in all analysis, cells were stained with Hoechst 33342 and the population was detected

by the photomultiplier tube (PMT) VL1 (450/40 nm) and the non- spermatozoa events (debris) were eliminated based on scatter plots [23].The green fluorescence of H₂DCFDA (ROS), carboxyfluorescein diacetate (plasma membrane integrity), rhodamine 123 (mitochondria functionality) has been read with BL1 photodetector (530/30 nm), the orange fluorescence of the merocyanine 540 (plasma membrane fluidity) was read with PMT BL2 (575/24 nm) . The red fluorescence of propidium iodide (plasma membrane integrity) was read with the PMT BL3 (640 nm Long Pass). Ten thousand spermatic events were analyzed per sample at a flow rate of 200 μL/second. [24, 25].

2.4.2.2. Plasma membrane integrity

This evaluation was performed by combining carboxyfluorescein diacetate (DCF) and propidium iodide (PI). DCF penetrates spermatozoa and is converted by esterases (enzymes that catalyze the hydrolysis of an ester bond) in viable cells in a non-permeable fluorescent compound that is retained in the cytoplasm, whereas the IP only penetrates the nucleus of cells with injured membrane. The working solution used for staining of spermatozoa contained PBS, Hoechst 33342 (16. 2 μM), DCF (20 μM) and IP (7.3 μM). Sperm were classified as not injured (DCF + /IP-), and injured (DCF + / IP +; DCF-/IP+; DCF-/IP-) [26, 27].

2.4.2.3. Fluidity of plasma membrane

For this evaluation was used the hydrophobic fluorescent dye, merocyanine 540 (2.7 Mm) and Hoechst 33342 (16. 2 μM) in PBS. Cells were sorted for high fluorescence (high fluidity) and low fluorescence (low fluidity) [26].

2.4.2.4. Functionality of mitochondria

This evaluation was performed using the fluorescent dye rhodamine 123 which stains mitochondria and concentrated in mitochondria with a high functionality (high electrochemical potential) emitting more green fluorescence. Rhodamine was present in the working solution containing PBS, Hoechst 33342 (16.2 μM) and rhodamine 123 (13 μM). Spermatozoa were classified as those with high functionality of mitochondria (high fluorescence, higher accumulation of rhodamine) and low functionality (low fluorescence, lower accumulation of rhodamine) [27].

2.4.2.5. Production of intracellular reactive oxygen species

For this evaluation was used the fluorescent dye 2',7'-dichlorofluorescein diacetate ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$), which is oxidized by intracellular ROS. This dye was present in the solution containing PBS, $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ (1.0 mM) and Hoechst 33342 (16.2 μM). The median of the green fluorescence intensity was used for the analysis [28].

2.5. Lipid peroxidation

The samples were collected before dilution to the treatments (after centrifugation) and at 24, 48, 72 and 96 hours at 17 ° C and stored at -20 ° C for later analysis. The determination of TBARS, an index of lipid peroxidation, was performed according to protocol Oakes and Van Der Kraak (2003) [29]. Fluorescence was measured with emission at 553 nm after excitation at 515 nm. Results were expressed as nMol of 1, 1, 3, 3-tetramethoxypropane (TMP) / 1.10^6 cells.

2.6. Statistical Analyses

Was conducted descriptive statistics for the dependent variables of the treatments. After the Shapiro-Wilk test all dependent variables was not normal.

Thereby, the means were compared using the Kruskal-Wallis test. To facilitate the understanding the data were expressed by descriptive statistics as mean and standard error. All analyzes were performed Statistix 9.0 software [30].

3. Results

The evaluations pre-treatment and storage for parameters of motility, plasma membrane integrity, mitochondrial function, low fluidity plasma membrane, reactive oxygen species production and index lipid peroxidation are shown in Table 1.

Table 1 - Descriptive statistics for spermatozoa from boars (*Sus scropha domestica*) before cooling: Parameters of sperm motility (MOT) (n = 22 ejaculates), plasma membrane integrity (PMI) (n = 22 ejaculates), mitochondrial function (MF) (n = 20 ejaculates), low fluidity plasma membrane (LFPM) (n = 22 ejaculates), reactive oxygen species production (ROS) (n = 20 ejaculates) and lipid peroxidation (LP) (n = 5 ejaculates).

Evaluation	Mean ± Standard Error
MOT (%)	71.36±0.74
PMI (%)	60.12±5.64
MF (%)	35.14±1.86
LFPM (%)	62.16±4.14
ROS	140.35±26.63
LP	0.15±0.08

* ROS: results expressed as median of the green fluorescence intensity of fluorescence; TBARS: results expressed in nmol of 1,1,3,3-tetramethoxypropane (TMP) / 1.10⁶ cells.

The variables of motility (Tab. 2), membrane integrity (Tab. 3), membrane fluidity (Tab.4) and functionality of mitochondria (Tab. 5) presented decrease over time

with statistical significance between the different storage times for each treatment singly (horizontal). For each storage time (vertical) there was no statistical difference between control and treatment (Tab.2).

Table 2 - Motility after treatment at different times of storage at 17 ° C - mean and standard error for swine spermatozoa (*Sus scropha domesticus*) (n = 22 ejaculates)

Treatment	24h	48h	72h	96h
Control	61.81±2.51 ^{Aa}	47.72±3.77 ^{Aab}	32.72±3.49 ^{Abc}	19.54±3.32 ^{Ac}
T1	61.36±2.57 ^{Aa}	45.45±3.46 ^{Aab}	32.72±3.55 ^{Abc}	20.90±3.14 ^{Ac}
T2	58.63±3.43 ^{Aa}	46.36±3.57 ^{Aab}	30.45±3.25 ^{Abc}	19.09±3.07 ^{Ac}
T3	58.18±2.84 ^{Aa}	45.00±3.82 ^{Aab}	30.00±3.48 ^{Abc}	18.18±3.39 ^{Ac}
T4	58.63±3.10 ^{Aa}	46.81±3.50 ^{Aab}	32.72±3.09 ^{Abc}	19.54±3.11 ^{Ac}

Treatments: Control (BTS), T1 (0.01 µM DNP in BTS), T2 (0.1 µM DNP in BTS), T3 (1.0 µM DNP in BTS) and T4 (10µM DNP in BTS). Means were compared using the Kruskal-Wallis test with a significance level of 0.05.

Different capital letters in the same column differ statistically.

Different lowercase letters in the same line differ statistically.

Table 3 - Integrity of plasma membrane after treatment at different times of storage at 17 ° C - mean and standard error for swine spermatozoa (*Sus scropha domestica*) (n = 22 ejaculates)

Treatment	24h	48h	72h	96h
Control	44.91±4.96 ^{Aa}	37.59±4.98 ^{Aa}	28.45±4.12 ^{Aab}	15.42±3.18 ^{Ab}
T1	37.90±4.69 ^{Aa}	38.61±5.01 ^{Aa}	28.24±4.97 ^{Aab}	15.86±2.82 ^{Ab}
T2	49.53±4.66 ^{Aa}	40.15±4.30 ^{Aab}	27.81±4.42 ^{Abc}	15.97±2.89 ^{Ac}
T3	38.60±4.51 ^{Aa}	37.30±5.21 ^{Aa}	25.36±4.47 ^{Aab}	19.35±4.23 ^{Ab}
T4	43.79±4.02 ^{Aa}	35.45±4.66 ^{Aa}	27.61±4.64 ^{Aab}	12.70±2.84 ^{Ab}

Treatments: Control (BTS), T1 (0.01 µM DNP in BTS), T2 (0.1 µM DNP in BTS), T3 (1.0 µM DNP in BTS) and T4 (10 µM DNP in BTS). Means were compared using the Kruskal-Wallis test with a significance level of 0.05.

Different capital letters in the same column differ statistically.

Different lowercase letters in the same line differ statistically.

Table 4 - Low-fluidity plasma membrane post-treatment in different periods of storage at 17 ° C - mean and standard error for swine spermatozoa (*Sus scropha domestica*) (n = 22 ejaculates)

Treatment	24h	48h	72h	96h
Control	48.0±3.65 ^{Aa}	39.72±3.32 ^{Aa}	26.28±2.11 ^{Ab}	25.59±1.74 ^{Ab}
T1	47.61±3.87 ^{Aa}	41.25±3.46 ^{Aa}	26.24±2.18 ^{Ab}	27.60±1.93 ^{Ab}
T2	45.42±3.64 ^{Aa}	38.34±2.86 ^{Aab}	30.02±2.56 ^{Abc}	29.55±3.39 ^{Ac}
T3	46.32±3.56 ^{Aa}	36.43±2.80 ^{Aab}	29.42±2.68 ^{Ab}	30.31±3.75 ^{Ab}
T4	46.36±3.64 ^{Aa}	37.55±4.16 ^{Aab}	28.34±2.45 ^{Ab}	28.91±3.64 ^{Ab}

Treatments: Control (BTS), T1 (0.01 µM DNP in BTS), T2 (0.1 µM DNP in BTS), T3 (1.0 µM DNP in BTS) and T4 (10 µM DNP in BTS). Means were compared using the Kruskal-Wallis test with a significance level of 0.05.

Different capital letters in the same column differ statistically.

Different lowercase letters in the same line differ statistically.

Table 5 - Mitochondrial Functionality after treatment in different times of storage at 17 ° C - mean and standard error for swine spermatozoa (*Sus scropha domestica*) (n = 20 ejaculates)

Treatment	24h	48h	72h	96h
Control	23.97±1.75 ^{Aa}	24.76±2.31 ^{Aa}	19.19±1.76 ^{Aab}	14.64±1.74 ^{Ab}
T1	24.13±2.46 ^{Aa}	23.50±2.73 ^{Aa}	20.48±1.49 ^{Aab}	14.34±1.58 ^{Ab}
T2	23.58±2.37 ^{Aa}	23.62±1.97 ^{Aa}	19.21±2.23 ^{Aab}	13.79±1.52 ^{Ab}
T3	23.74±1.92 ^{Aa}	20.17±1.85 ^{Aa}	18.56±1.56 ^{Aab}	12.89±1.54 ^{Ab}
T4	23.37±2.48 ^{Aa}	20.64±2.01 ^{Aa}	19.99±2.22 ^{Aab}	12.34±1.58 ^{Ab}

Treatments: Control (BTS), T1 (0.01 µM DNP in BTS), T2 (0.1 µM DNP in BTS), T3 (1.0 µM DNP in BTS) and T4 (10 µM DNP in BTS). Means were compared using the Kruskal-Wallis test with a significance level of 0.05.

Different capital letters in the same column differ statistically.

Different lowercase letters in the same line differ statistically.

The variables of production of intracellular reactive oxygen species (Tab. 6) and lipid peroxidation (Tab. 7) no statistical difference between the different storage times, as well as between the different treatments.

Table 6 - Production of intracellular reactive oxygen species after treatment at different times of storage at 17 ° C - mean and standard error for swine spermatozoa (*Sus scropha domesticus*) (n = 20 ejaculates). Values expressed as median fluorescence intensity.

Treatment	24h	48h	72h	96h
Control	43.03±4.14	41.86±6.78	58.15±6.00	67.84±9.78
T1	42.68±4.86	41.49±8.53	54.79±7.34	68.01±9.09
T2	39.06±4.32	40.22±6.95	62.52±15.13	68.53±9.53
T3	42.76±4.59	38.54±6.86	60.31±8.53	66.92±8.94
T4	47.44±4.12	39.79±7.30	53.42±6.90	63.72±8.38

Treatments: Control (BTS), T1 (0.01 µM DNP in BTS), T2 (0.1 µM DNP in BTS), T3 (1.0 µM DNP in BTS) and T4 (10 µM DNP in BTS). Means were compared using the Kruskal-Wallis test with a significance level of 0.05. There was no statistical difference between the different times and treatments.

Table 7 - Index of lipid peroxidation post treatment, values expressed in nMol of TMP/1.106 swine sperm (*Sus scropha domesticus*) – mean and standard error (n = 5 ejaculates).

Treatment	24h	48h	72h	96h
Control	0.22±0.13	0.04±0.03	0.04±0.03	0.55±0.51
T1	0.06±0.02	0.04± 0,06	0.06±0.020	0.06±0.01
T2	0.11±0.04	0.56±0.51	0.05±0.02	0.05±0.02
T3	0.13±0.05	0.37±0.33	0.05±0.01	0.06±0.03
T4	0.04±0,03	0.05±0,05	0.08±0.03	0.06±0.03

Treatments: Control (BTS), T1 (0.01 µM DNP in BTS), T2 (0.1 µM DNP in BTS), T3 (1.0 µM DNP in BTS) and T4 (10 µM DNP in BTS). Means were compared using the Kruskal-Wallis test with a significance level of 0.05. There was no statistical difference between the different times and treatments.

4. Discussion

In this paper was evaluated the effect of the uncoupler 2, 4 dinitrophenol on motility, integrity and fluidity of the plasma membrane, functionality of mitochondria, beyond of the parameters of oxidative stress, as lipid peroxidation and production of reactive oxygen species in swine spermatozoa during cooling. This study have fundamental importance because were not found articles with cooled swine semen and mitochondrial uncoupling by DNP, only was found one article that reported the positive effects of this substance on swine morulae [31].

The variables of motility, cell plasma membrane integrity, fluidity of the plasma membrane, mitochondria functionality obtained decline over time, demonstrating the fall in viability of the gametes. This decrease in viability, especially from 72 hours is in agreement with the literature [5].

The treatments did not alter the motility of spermatozoa when compared to the control, confirming in part with the data obtained by Dong et al., (2010) [15] which found no significant effect of DNP on spermatozoa motility in male monkey with high post-thaw motility (equal to or greater than 50%). It may be proposed that the samples used in this study did not have significantly changed parameter motility in the presence of DNP for presenting an average motility before cooling at around 70%, perhaps being required motility less than 50% for DNP act, but does not have a physiological explanation for this fact.

The study by Dong et al., 2010 [15] was limited to assess sperm fertilizing ability in the presence of DNP through, only spermatozoa motility. However, the

fertilizing capacity of sperm is a complex phenomenon that has numerous organelles working together [32]. In this context, the mitochondria are a key organelle in the fertilization process for generating energy in the form of ATP and provide the spermatozoa motility [33]. The plasma membrane maintains cellular metabolism by performing selective permeability, and contain proteins for recognition and binding to the oocyte [34]. The increase in plasma membrane fluidity by cholesterol efflux is a physiological phenomenon which must occur in order controlled chronologically and spatially [35]. Thereby, in the female reproductive tract the increased fluidity moments before fertilization is related to spermatozoa capacitation which enables fertilization, whereas fluidity obtained early during the cooling process, it interferes in selective permeability of gamete may adversely impair metabolism and fertilizing ability [35]. Thus, each of the organelles evaluated in this study are key sites related to the fertilizing capacity of gamete and are adversely affected when the cell undergoes oxidative stress [36].

The mitochondria, in addition to producing ATP is the site of action of DNP, being fundamental your evaluation. It can be noted on the Tab.5, any statistical difference between control and other treatments for the functionality of mitochondria. Nevertheless, it was expected that at least the T4 (10 μ M DNP) obtain low mitochondrial functionality, because the primary function of DNP is to dissipate the proton gradient. In this context, due to the principle of the technique used to evaluate the functionality of mitochondria (using rhodamine 123), the rhodamine 123 should accumulate less because a low proton gradient would induce lower affinity for the dye [12, 26, 37]. If none of the concentrations produced significant effects on the electrochemical gradient,

also the concentrations would not be able to accelerate the electron transport chain and decrease the production of reactive oxygen species.

The fact of DNP does not dissipate the electrochemical gradient, as previously mentioned, may have generated results in Tab.6 and Tab.7. Therefore, DNP, was not capable of reducing ROS production that cause oxidative stress (Table 6) and was not able to lower the plasma membrane lipid peroxidation by the TBARS (Tab.7). Therefore, the inability of DNP at diferents concentrations tested of reduces ROS and the TBARS was reflected in a decrease in membrane integrity (Tab. 3) and increased fluidity (Tab.4) over time.

It would be precipitate to conclude that the DNP simply does not exert any action on swine spermatozoa and is valid to consider the conditions which the present study took place. Thus, one possibility for these results is the fact cooling decrease the fluidity of the sperm membrane and subsequent penetration of substances be hampered. Could it be that the DNP at reduced temperatures has difficulty penetrating and can not act on the organelles, especially mitochondria [38].

In this context, there is the possibility of adding the substance to the semen at room temperature immediately after collection because the metabolism is accelerated and the penetration of the DNP can be facilitated.

Another possibility would be to use higher concentrations of DNP in a future study, perhaps because higher concentrations can reflect on variables of sperm fertilizing ability in cooling swine spermatozoa. Nevertheless, as increased concentrations of DNP can lead to dysfunction of mitochondria, it would make

interesting association of a test for the measurement of ATP, because there is no report of the range of the concentrations that compromises ATP production by mitochondria spermatozoa [12, 15].

5. Conclusion

The 2,4 dinitrophenol (DNP), on the concentrations tested, did not get effects on variables evaluated independent of storage time at 17 ° C.

6. References

- [1] P.B. Inskip, R.H. Hammerstedt, A colorimetric method to assess endogenous metabolism and its application to the study of bovine sperm. *J Biochem Biophys Methods* 7 (1983) 199-210.
- [2] P.C. Whitters, *Comparative Animal Physiology*. Ed. Saunders College Publishing, 1992, 607 pp.
- [3] P.W. Hochachka, G.N. Somero *Biochemical Adaptation: mechanism and process in physiological evolution*. Oxford University Press, New York, 2002 466 p.
- [4] T. Katila, Procedures, for handling fresh stallion semen. *Theriogenol* 48 (1997)1217-1227.
- [5] L.D.S. Murgas, M.G. Zangerônimo, A.G.O. Santos, S.L. Oliveira Oxitocina no sêmen suíno heterospermico resfriado a 15 °C. *Ciênc Anim Bras*, 3 (2002) 3-40.
- [6] J. Strezezek, S. Lapkiewicz, M. Lecewicz, A note on antioxidant capacity of boar seminal plasma. *Anim Sci Pap Rep* 17(1999) 181–188.
- [7] J.H. Hu, Q.W. Li, T. Zhang, Z.L. Jiang, Effect of Gynostemma Pentaphyllum Polysaccharide on boar spermatozoa quality following freezing–thawing. *Cryobiol*, 59 (2009) 244–249.
- [8] B.A. Ball, V. Medina , C.G. Gravance , J. Baumbe, Effects of antioxidants on preservation of motility, viability and acrosomal integrity of equine spermatozoa during storage at 5 °C. *Theriogenol* 56 (2001) 577-589.
- [9] P.C. Penny, R.C. Noble, A. Maldjian, S. Cerolini, Potential role of lipids for the enhancement of boar fertility and fecundity. *Pig News Inf* 21(2000) 119-126.
- [10] L.A. Johnson, R.J. Gerrits, E.P. Young, The fatty acid composition of porcine spermatozoa phospholipids. *Biol Reprod*, 1(1969) 330–334.
- [11] K.B. Wallace e A.A. Starkov, Mitochondrial targets of drug toxicity *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40(2000)353–88.

- [12] F.G. De Felice, S.T. Ferreira, Novel Neuroprotective, Neuritogenic and Anti-amyloidogenic Properties of 2,4-Dinitrophenol: The Gentle Face of Janus. *Life*, 58 (2006) 185 – 191.
- [13] V.P. Skulachev, Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics *Biochim Biophys Acta*, 1363 (1998) 100-24.
- [14] A. Hurtado de Llera, D. Martin-Hidalgo, M.C. Gil, L.J. Garcia-Marin, M.J. Bragado, AMP-activated kinase AMPK is expressed in boar spermatozoa and regulates motility, *PLoS One* 7 (6) (2012) e38840.
- [15] Q. Dong , T.L. Tollner , S.E. Rodenburg , D.L. Hill , C.A. Vande Voort, Antioxidants, Oxyrase, and mitochondrial uncoupler 2,4-dinitrophenol improved postthaw survival of rhesus monkey sperm from ejaculates with low cryosurvival *Fertil Steril* 94 (2010) 2359-61.
- [16] R.S. Prather, R.J. Hawley, D.B. Carter, L. Lai, J.L. Greenstein Transgenic swine for biomedicine and agriculture. *Theriogenol* 59 (2003) 115–123.
- [17] FAO - Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO 2010) *FAO Statistical Yearbook 2013 – World Food and Agriculture*. Disponível em: <<https://www.fao.org.br/publicacoes.asp>>. Acesso em: 26 fev. 2014.
- [18] R. Dantzer, The pig as a model for behavioral research. *Lab An Sci* 36 (1986) 362-5.
- [19] F.P. Bortolozzo, I. Wentz, D. Dallanora, Situação atual da inseminação artificial em suínos. *Acta Sci Vet*, 33 (2005) 17- 32.
- [20] V.G. Pursel, L.A. Johnson, Freezing of boar spermatozoa: Freezing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *Jour Anim Sci*, 40 (1975) 99-102.
- [21] H.J. Bearden, J.W. Fuquay Semen evaluation, in: Bearden HJ, Fuquay JW. *Applied Animal Reproduction*. 4th Ed., New Jersey: Prentice Hall, 1997, pp. 159-170.
- [22] CBRA Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2ª Ed. Belo Horizonte: CBRA, 49 p. 1998.
- [23] S. Nagy, J.Jansen, E.K. Topper, B.M. Gadella. A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles *Biol Reprod*. 68 (2003) 1828-35.
- [24] A.M. Petrunkina, G. Volker, H. Brandt, E. Töpfer-Petersen, D. Waberski, Functional significance of responsiveness to capacitating conditions in boar spermatozoa. *Theriogenol* 64 (2005) 1766–82.
- [25] E. Piehler, A.M. Petrunkina, M. Ekhlesi-Hundrieser, E. Töpfer-Petersen, Dynamic quantification of the tyrosine phosphorylation of the sperm surface proteins during capacitation *in vitro*. *Cytomet* 69 (2005) 1062–70.

- [26] R. Fernández-Gago, J.C. Domínguez, F. Martínez-Pastor, Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: A flow cytometry study *Theriogenol* 80 (2013) 400–410.
- [27] L. Gillan, G. Evans, W.M.C. Maxwell, Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential *Theriogenol* 63(2005) 445–457.
- [28] A.E. Domínguez-Rebolledo, F. Martínez-Pastor, A.F. Bisbal, J.L. Ros-Santaella, O. García-Álvarez, A. Maroto-Morales, et al., Response of thawed epididymal red deer spermatozoa to increasing concentrations of hydrogen peroxide, and importance of individual male variability. *Reprod Domest Anim* 46 (2011) 393–403.
- [29] K.D. Oakes and G.J. Van Der Kraak, Utility of the TBARS assay in detection oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquat Toxicol*, 63 (2003) 447–463.
- [30] STATISTIX® 9 Analytical Software. User's manual, 396 p, 2008.
- [31] Z. Macháty, J.G. Thompson, L.R. Abeydeera, B.N. Day, R.S. Prather, Inhibitors of mitochondrial ATP production at the time of compaction improve development of in vitro produced porcine embryos. *Mol Reprod Dev.* 58(2001) 39-44.
- [32] P.P.N. Snoeck, M. Henry, M.I.V, Melo Efeito de diferentes diluidores sobre a viabilidade espermática pós- descongelamento de sêmen equino *Arq Bras Med Vet Zootec*, 59 (2007) 56-64.
- [33] Z. Yao, L.W. Crim, G.F. Richardson, C.J, Emerson Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout *Macrozoarces americanus* L. sperm after cryopreservation. *Aquacult* 181 (2000) 361–375.
- [34] D. Ellis, J. Sadaf Shadan, P.S. James, R.M. Henderson, J.M. Edwardson, A. Hutchings and R. Jones, Post-testicular development of a novel membrane substructure within the equatorial segment of ram, bull, boar, and goat spermatozoa as viewed by atomic force microscopy *Jour Struct Biol* 138 (2002) 187–198
- [35] A. Hurtado de Llera, D. Martín-Hidalgo, J.E. Rodríguez-Gil, M.C. Gil, L.J. García-Marin, L.J. Bragado, M. Julia, AMP-activated kinase, AMPK, is involved in the maintenance of plasma membrane organization in boar spermatozoa *Biochim et Biophys Acta* 1828 (2013) 2143–2151.
- [36] C. Malo, L. Gil, N. Gonzalez, F. Martínez, R. Cano, I. De Blas, E. Espinosa, Antioxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: Comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). *Cryobiol*, 61 (2010) 142–147.
- [37] A.M. Gorman, A. Samali, A.J. McGowan, T.G. Cotter, Use of flow cytometry techniques in studying mechanisms of apoptosis in leukemic cells *Cytomet* 29 (1997) 97-105.
- [38] J.R. Hazel, Effects of temperature on the structure and metabolism of cell membranes in fish. *Am J Physiol* 246 (1984) 460-470.

Considerações finais

Apesar dos efeitos nocivos de altas concentrações do 2,4 dinitrofenol (DNP), a utilização de baixas concentrações demonstra efeitos benéficos, principalmente neuroprotetores, demonstrando um campo interessante de estudo. O presente estudo avaliou os efeitos do DNP sobre organelas fundamentais para a viabilidade e capacidade fertilizante dos espermatozóides, além de em parâmetros relacionados ao estresse oxidativo de espermatozoides suíno resfriado a 17°C. A importância do estudo reside no fato do DNP ter potencial, já demonstrado em macacos, da manutenção da capacidade fertilizante no que se refere à motilidade espermática, mas não ter sido avaliado em suínos. Apesar disso, o DNP não gerou reflexos sobre as variáveis analisadas nesse estudo, sendo essas a motilidade, a integridade e fluidez de membrana plasmática, a funcionalidade de mitocôndria, a produção de espécies reativas de oxigênio e o índice de lipoperoxidação por TBARS.

Entretanto, concluir que o DNP simplesmente não exerce ação alguma sobre espermatozóides suínos pode ser precipitado, sendo válido considerar as condições as quais a célula é submetida durante o resfriamento. Logo, uma possibilidade para os resultados encontrados seria o fato de que ocorre diminuição da formação de ERO durante o resfriamento, de modo que a ação do DNP pode não ser relevante quando o metabolismo encontra-se desacelerado. Além disso, o resfriamento diminui a fluidez da membrana espermática e conseqüentemente a dificultando penetração de substâncias, sendo possível inferir que o DNP possa não agir sobre as organelas, especialmente as mitocôndrias por não conseguir penetrar a célula espermática.

Desse modo, surge a possibilidade de adicionar a substância ao sêmen em temperatura ambiente, logo após a coleta, desse modo o DNP poderia gerar efeitos

sobre o gradiente de prótons, pois nessas condições o metabolismo encontra-se mais acelerado em função do resfriamento e consequentemente a produção de ERO é maior.

Outro fato a ser considerado seria que as concentrações testadas foram insuficientes para gerar efeitos nos espermatozóides suínos. Assim, surge a possibilidade de utilização de concentrações mais elevadas do DNP a partir do de T4 (10 μ M) em um estudo futuro que possam refletir sobre variáveis de capacidade fertilizante em espermatozoides suínos resfriados. Apesar disso, como um aumento das concentrações de DNP, pode acarretar em disfunções da mitocôndria, tornar-se-ia interessante a associação de um teste para dosagem de ATP, pois não se tem relatos da faixa que passa a comprometer a produção de ATP pelas mitocôndrias espermáticas.

Referências Gerais

AGARWAL, A.; SALEH, R.A.; BEDAIWY, M.A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and Sterility**, v. 79, p. 829–43, 2003.

ALMOND, G.W.; BRITT, J.H; CARR, J.; FLOWER, W.; GLOSSOP, C.; MORROW, M.; SEE, T. The swine AI book. A field and laboratory technician's guide to artificial insemination in swine, Editorial Ruth Cronje, North Carolina State University. Raleigh. 1994, 180p.

ALVAREZ, J.G; TOUCHSTONE, J.C.; BLASCO, L.; STOREY, B.T. Spontaneous lipid peroxidation and producing of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.8, p. 338–348, 1987.

ANDREWS Z.B.; HORVATH T.L. Uncoupling protein-2 regulates lifespan in mice. **American Journal Physiology Endocrinology and Metabolism**, v. 96, p. 621–627, 2009.

AQARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R.K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.3, p. 1–21, 2005.

ARSENJEVIC, D.; ONUMA, H.; PECQUEUR, C.; RAIMBAULT, S.; MANNING, B.S.; MIROUX, B.; COUPLAN, E.; ALVES-GUERRA, M.C.; GOUBERN, M.; SURWIT, R.; BOUILLAUD, F.; RICHARD, D.; COLLINS, S.; RICQUIER, D. Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. **Nature Genetics**, v.26, p. 435– 439, 2000.

BARBIERI, M., BOCCARDI, V., ESPOSITO, A., PAPA, M., VESTINI, F., et al. A/ASP/ VAL allele combination of IGF1R, IRS2, and UCP2 genes is associated with better metabolic profile, preserved energy expenditure parameters, and low mortality rate in longevity. **Age**, v. 34, p. 235–245, 2011.

BARROS, M.H., BANDY, B., TAHARA, E.B., KOWALTOWSKI, A. J. Higher respiratory activity decreases mitochondrial reactive oxygen release and increases life span in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal Biological. Chemistry**, v. 279, p. 49883 – 49888, 2004.

BATHGATE, R. Antioxidant Mechanisms and their Benefit on Post-thaw Boar Sperm Quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46 (Suppl 2), p. 23–25, 2011.

BAUMBER, J.; BALL, B.A.; LINFOR, J.J.; MEYERS, S.A. Reactive oxygen species and cryopreservation promote DNA fragmentation in equine spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 24, p. 621–628, 2003.

BECONI, M.T.; FRANZIA, C.R.; MORA, N.G.; ARANCHINO, M.A. Effect of natural antioxidants on frozen bovine semen preservation. **Theriogenology**, v.40, p. 841–851, 1993.

BIZARD, G.; VANLERENBERGHE, J.; MILBLED, G.; GUERRIN & ROBELET A. Action du 2,4-dinitrophenol sur la chl6r6se du rat. (Recherches sur le foie perfus6.) **Journal of Physiology**, v. 52, p. 21-22, 1960.

BOYER J. L. Canalicular bile formation in the isolated perfused rat liver. **American Journal of Physiology**, v. 221, p. 1156- 1163, 1971.

BORN, G. V. R.. Tension, work and changes in adenosine triphosphate concentrations of the isolated taenia coli of the guinea pig. **Journal Physiology** (London) v. 128, p. 38 1955.

BRAND, M.D.; BUCKINGHAM, J.A.; ESTEVES, T.C.; GREEN, K.; LAMBERT, A.J.; et al. Mitochondrial superoxide and ageing: uncoupling-protein activity and superoxide production. **Biochemical Society Symposia**, v. 71, p. 203–213, 2004.

BRAND, M.D.; PAMPLONA, R.; PORTERO-OTIN, M.; REQUENA, J.R.; ROEBUCK, S.J. et al. Oxidative damage and phospholipids fatty acyl composition in skeletal muscle mitochondria from mice underexpressing or overexpressing uncoupling protein 3. **Biochemistry Journal**, v. 368, p.597–603, 2002.

BRAND, M. D. Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. **Experimental Gerontology**, v. 35, p. 811 – 820, 2000.

BREZEZINSKA-SLEBODZINSKA, E., SLEBODZINSKA, A.B.; PIETRAS, B., WIECZOREK, G. Antioxidant effect of vitamin E and glutathione on lipid peroxidation in boar semen plasma. **Biological Trace Element Research**, v.47, p. 69–74, 1995.

BROWN-BORG, H.M.; RAKOCZY, S.G.; ROMANICK, M.A.; KENNEDY, M.A. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-1 on hepatocyte antioxidative enzymes. **Experimental Biology and Medicine (Maywood)** v. 227, p. 94–104, 2002.

BUCAK, M.N.; ATESSAHIN, A.; VARISH, O.; YUCE, A.; AKCAY, A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen: microscopic and oxidative stress parameters after freeze–thawing process. **Theriogenology**, v. 67, p. 1060–1067, 2007.

CEROLINI, S.; MALDJIAN, A.; PIZZI, F.; GLIOZZI, T.M. Changes in sperm quality and lipid composition during cryopreservation of boar semen. **Reproduction**, v.121, p.395–401, 2001.

CHATTERJEE, S.; GAGNON, C.; Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v.59, p. 451–458, 2001.

COOPER, D.K.C.; KOREN, E.; ORIOL, R. Genetically engineered pigs. **Lancet** v.342, p. 682–3, 1993.

COSTA, C.P.; FERREIRA, M.C. Preservação de microrganismos: revisão. **Revista de Microbiologia**, São Paulo, v.22, p. 263-268, 1991.

COZZI E.; BHATTI, F.; SCHMOECKEL, M.; CHAVEZ, G.; SMITH, K.G.; ZAIDI, A.; et al. Long-term survival of non-human primates receiving life-supporting transgenic porcine kidney xenografts. **Transplantation**, v.70, p.15–21, 2000.

DAMON, M.; VINCENT, A.; LOMBARDI, A.; HERPIN, P. First evidence of uncoupling protein-2 (UCP-2) and -3 (UCP-3) gene expression in piglet skeletal muscle and adipose tissue. **Gene** v. 246, p. 133–41, 2000.

DANTZER, R. The pig as a model for behavioral research. **Laboratory Animal Science**; v. 36, p. 362-5, 1986.

DE FELICE, F.G.; FERREIRA, S.T. Novel Neuroprotective, Neuritogenic and Anti-amyloidogenic Properties of 2,4-Dinitrophenol: The Gentle Face of Janus **Life**, v.58, p. 185 – 191, 2006.

DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 18, p. 487–95, 1995.

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

DIAMOND, L.E., QUINN, C.M., MARTIN, M.J., LAWSON, J., PLATT, J.L., LOGAN, J.S., et al. A human CD46 transgenic pig model system for the study of discordant xenotransplantation. **Transplantation**, v. 71, p. 132–42, 2001.

DONG, Q.; TOLLNER, T.L.; RODENBURG, S.E.; HILL, D.L.; VANDE VOORT, C.A. Antioxidants, Oxyrase, and mitochondrial uncoupler 2, 4-dinitrophenol improved postthaw survival of rhesus monkey sperm from ejaculates with low cryosurvival. **Fertility and Sterility**, v. 94, p. 2359-61, 2010.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47–95, 2002.

ECHTAY, K.S. Mitochondrial uncoupling proteins - What is their physiological role? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 43, p. 1351–1371, 2007.

ECHTAY, K.S., ROUSSEL, D., ST-PIERRE, J., JEKABSONS, M.B., CADENAS, S., STUART, J.A.; HARPER, J.A., ROEBUCK, S.J., MORRISON, A., PICKERING, S., CLAPHAM, J.C., BRAND, M.D. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. **Nature**, v. 415, p. 96–99, 2002.

EKSER, B.; RIGOTTI, P.; GRIDELLI, B.; COOPER, D.K.C. Xenotransplantation of solid organs in the pig-to-primate model **Transplant Immunology** v.21,p. 87–92, 2009.

ERLANSON-ALBERTSSON, C. The role of uncoupling proteins in the regulation of metabolism. **Acta Physiology Scandinavia** v.178, p. 405–12, 2003.

FAO 2010 - ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS PARA ALIMENTAÇÃO E AGRICULTURA (FAO) FAO STATISTICAL YEARBOOK 2013 (DADOS DE 2010) – WORLD FOOD AND AGRICULTURE. Disponível em: <<https://www.fao.org.br/publicacoes.asp>> Acessado em: 26 de fevereiro de 2014.

FAO 1993 - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Agrobiodiversity: the case for conserving domestic and related animals. FAO Fact sheet on the conservation of domestic animal genetic resources, 1993. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/v1650t/v1650t0y.htm>> Acessado em: 13 de novembro de 2012.

FLEURY, C.; NEVEROVA, M.; COLLINS, S.; RAIMBAULT, S.; CHAMPIGNY, O. ; LEVI-MEYRUEIS, C. ; BOUILLAUD, F.; SELDIN, M.F.; SURWIT, R.S. ; RICQUIER, D.; WARDEN, C.H. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia, **Nature Genetics** v.15, p. 269–272, 1997.

FOOTE, R.H.; PARKS, J.E. Factors affecting preservation and fertility of bull sperm: a brief review. **Reproduction Fertility and Development**, v. 5, p. 665–673, 1993.

FORD, W.C. Regulation of sperm functions by reactive oxygen species. **Human Reproduction Update**, v.10, p. 387–399, 2004.

FRIDELL, Y.W.; HOH, M.; KRÉNEISZ, O.; HOSIER, S.; CHANG, C.; et al. Increased uncoupling protein (UCP) activity in *Drosophila* insulin-producing neurons attenuates insulin signaling and extends lifespan. **Ageing**, v.1, p. 699–713, 2009.

FRIDELL, Y.W.; SÁNCHEZ-BLANCO, A.; SILVIA, B.A.; HELFAND, S.L. Functional characterization of a *Drosophila* mitochondrial uncoupling protein. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v.36, p. 219–228, 2004.

FUNAHASHI, H.; SANO, T. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 °C. **Theriogenology**, v. 63, p. 1605–1616, 2005.

GEHRING, P. J. BUERGE, J. F. The Cataractogenic Activity of 2,4 Dinitrophenol in Ducks and Rabbits **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 14, p. 475-486, 1969.

GRIVEAU, J.F.; LE LANNOU, D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. **International Journal of Andrology**, v.20, p. 61–69, 1997.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and Medicine. 4th. Oxford University Press: New York, 2007.

HAMMERSTEDT, R.H.; GRAHAM, J.K.; NOLAN, J.P. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. **Journal of Andrology**, v.11, p. 73–88, 1990.

HARPER, J.A.; DICKINSON, K.; BRAND, M.D. Mitochondrial uncoupling as a target for drug development for the treatment of obesity. **Obesity Reviews** v. 2, p.255–65, 2001.

HARRIS, M. O.; E COCORAN, J. J. Toxicological Profile for Dinitrophenols. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, 1995.

HAZEL, J.R. Effects of temperature on the structure and metabolism of cell membranes in fish. **American Journal Physiology**. v, 246, p. 460-470, 1984.

HERRERO, M.B.; de LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Nitric oxide is a signaling molecule in spermatozoa. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, p. 419–425, 2003.

HOCHACHKA P.W.; SOMERO G.N. Biochemical Adaptation: mechanism and process in physiological evolution. Oxford University Press, New York, 2002 466 p.

HORN, L.; KUMAMOTO, M. Effects of 2:4-Dinitrophenol on the Electrical and Mechanical Activity of Vascular Smooth Muscle **Microvascular Research**, v. 2, p. 182-187, 1970.

HOUSER, S.L.; KUWAKI, K.; KNOSALLA, C.; DOR, F.J.; GOLLACKNER, B.; CHENG, J, et al. Thrombotic microangiopathy and graft arteriopathy in pig hearts following transplantation into baboons. **Xenotransplantation**, v.11, p. 416–25, 2004.

HU, J. H.; LI, Q.W.; ZHANG, T.; JIANG, Z.L. Effect of Gynostemma Pentaphyllum Polysaccharide on boar spermatozoa quality following freezing–thawing. **Cryobiology**, v. 59, p. 244–249, 2009.

HUGHES, H.C. Swine in cardiovascular research. **Laboratory Animal Science**, v.36, p.348-50, 1986.

HUNT, M.C.; NOUSIAINEN, S.E.; HUTTUNEN, M.K.; ORII, K.E.; SVENSSON, L.T.; ALEXSON, S.E. Peroxisome proliferatorinduced long chain acyl-CoA thioesterases comprise a highly conserved novel multi-gene family involved in lipid metabolism. **The Journal of Biological Chemistry** v.274, p. 34317–26, 1999.

JOHNSON, L. A; AALBERS, J.G.; GROOTEN, H.J.G. Artificial insemination of swine: Fecundiy of boar semen stored in Beltsville TS BTS., Modified Modena (MM), or MR-A and inseminated on one three and four days after collection. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 23, p. 49-55, 1988.

JOHNSON, L.A.; GERRITS, R.J.; YOUNG, E.P. The fatty acid composition of porcine spermatozoa phospholipids. **Biology of Reproduction**, v. 1, p. 330–334, 1969.

JOHNSON, L. A. et al. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 143-172, 2000.

KARABINUS, D.S.; VOGLER, C.J.; SAACKE, R.G.; EVENSON, D.P. Chromatin structural changes in sperm after scrotal insulation of Holstein bulls. **Journal of Andrology**, v. 18, p. 549-555, 1997.

KERRIGAN, C.L.; ZELT, R.G.; THOMSON, J.G.; DIANO, E. The pig as na experimental animal in plastic surgery research for the study of skin flaps, myocutaneous flaps and fasciocutaneous flaps. **Laboratory Animal Science**, v. 36, p.408-12, 1986.

KIRK, A.D. Crossing the bridge: large animal models in translational transplantation research. **Immunological Reviews**; v. 196, p. 176, 2003.

KNOSALLA, C.; GOLLACKNER, B.; COOPER, D.K.C. Anti-CD154 monoclonal antibody and thromboembolism revisited. **Transplantation**, v.74, p.416–7, 2002.

KODAMA, H.; KURIBAYASHI, Y.; GAGNON, C. Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. **Journal of Andrology**, v. 17, p. 151–157, 1996.

KOKETSU, K.; KIMIZUKA, H.; KITAMURA, R.. Depolarization of frog's skeletal muscle membrane by 2:4-Dinitrophenol. **Journal Cellular Comparative Physiology** 63, 165-176, 1964.

KORDE, A. S., PETTIGREW, L. C., CRADDOCK, S. D., AND MARAGOS, W. F. The mitochondrial uncoupler 2,4-dinitrophenol attenuates tissue damage and improves mitochondrial homeostasis following transient focal cerebral ischemia. **Journal Neurochemistry**, v.94,p. 1676 – 1684, 2005b.

KORDE, A. S.; SULLIVAN, P. G.; E MARAGOS, W. F. The uncoupling agent 2,4-dinitrophenol improves mitochondrial homeostasis following striatal quinolinic acid injections. **Journal Neurotrauma**, v.22, p. 1142 – 1149, 2005a.

KRAUSS, S.; ZHANG, C.Y.; LOWELL, B.B., A significant portion of mitochondrial proton leak in intact thymocytes depends on expression of UCP2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v.99, p. 118–122, 2002.

KURIHARA-BEGSTROM T.; WOODWORTH, M.; FEISULLIN, S.; BEALL, P. Characterization of the Yucatan miniature pig skin and small intestine for pharmaceutical applications. **Laboratory Animal Science**, v. 36, p.396-9, 1986.

KUWAKI, K.; TSENG, Y.L.; DOR, F.J.; SHIMIZU, A.; HOUSER, S.L.; SANDERSON, T.M., et al. Heart transplantation in baboons using α 1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience. **Nature Medicine**, v.11, p. 29–31, 2005.

LEON, J.; ACUNA-CASTROVIEJO, D.; SAINZ, R.M.; MAYO, J.C.; TAN, D.X.; REITER, R.J. Melatonin and mitochondrial function. **Life Science**, v.75, p.765–90, 2004.

LEUENBERGER, C.; CZUCZWA, J.; TREMP, J.; GIGER, W. Nitrated phenols in rain: atmospheric occurrence of phytotoxic pollutants, **Chemosphere** v. 17, p. 511–515, 1988.

LI, Y.C. ; HU, X.Q.; XIAO, L.J., HU, Z.Y. ; GUO, J.; ZHANG, K.Y.; SONG, X.X. , LIU, Y.X. An oligonucleotide microarray study on gene expression profile in mouse testis of experimental cryptorchidism, **Frontiers in Bioscience**, v.11, p.2465–2482, 2006.

LODISH, H., Berk A, Zipursky, S. L., Matsudaira, P., Baltimore, D. and Darnell, J. **Molecular Cell Biology**. Fourth edition, W. H. Freeman and Company, New York, 1999.

MACHÁTY, Z.; THOMPSON, J.G.; ABEYDEERA, L.R.; DAY, B.N.; PRATHER, R.S. Inhibitors of mitochondrial ATP production at the time of compaction improve development of in vitro produced porcine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 58, p. 39-44, 2001.

MAKKER, K.; AGARWAL, A.; SHARMA, R. Oxidative stress & male infertility. **Indian Journal Medicine Research**, v.129, p. 357–367, 2009.

MARAGOS, W. F., ROCKICH, K. T., DEAN, J. J., YOUNG, K. L. Pre- or post-treatment with the mitochondrial uncoupler 2,4-dinitrophenol attenuates striatal quinolinate lesions. **Brain Research**. v. 966, p. 312 – 316, 2003.

MARTI, E.; MARA, L.; MARTI, J.I.; MUIN˜ O-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Seasonal variations in antioxidant enzyme activity in ram seminal plasma. **Theriogenology**, v. 67, p. 1446–1454, 2007.

MARTÍN- HIDALGO, D.; BARÓN, F.J.; BRAGADO, M.J. CARMONA, P. ROBINA, A. GARCÍA-MARÍN, L.J. GIL, M.C. The effect of melatonin on the quality of extended boar semen after long-term storage at 17 °C. **Theriogenology**, v.75,p. 1550–1560, 2011.

MATTIASSON, G.; SHAMLOO, M.; GIDO, G.; MATHI, K.; TOMASEVIC, G.; YI, S.; WARDEN, C. H.; CASTILHO, R. F.; MELCHER, T.; GONZALEZ-ZULUETA, M.; NIKOLICH, K.; WIELOCH, T. Uncoupling protein-2 prevents neuronal death and diminishes brain dysfunction after stroke and brain trauma. **Nature Medicine**, V.9, p. 1062 – 1068, 2003.

MAXWELL, W.M.; SALAMON, S. Liquid storage of ram semen: a review. **Reproduction Fertility and Development**, v.5, p. 613–638, 1993.

MORAN, J. M.; MADEJÓN, L.; ORTEGA-FERRUSOLA, C.; PEÑA, F. J. Nitric oxide induces caspase activity in boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 70, p. 91–96, 2008.

MURGAS, L.D.S.; ZANGERÔNIMO, M.G.; SANTOS, A.G.O.; OLIVEIRA, S.L. Oxitocina no sêmen suíno heterospérmico resfriado a 15°C. **Ciência Animal Brasileira**. v.3, p. 33-40, 2002.

MWESIGWA, J.; COLLINS, D.J.; VOLKOV, A.G. Electrochemical signaling in green plants: effects of 2,4-dinitrophenol on variation and action potentials in soybean **Bioelectrochemistry** v. 51, p. 201–205, 2000.

NEGRE-SALVAYRE, A.; C. HIRTZ, G.; CARRERA, R.; CAZENAVE, M.; TROLY, R.; SALVAYRE, L.; PENICAUD, L.; CASTEILLA. A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation, **The FASEB Journal**, v.11, p. 809–815, 1997.

NIEMANN, H.; VERHOEYEN, E.; WONIGEIT, K.; LORENZ, R.; HECKER, J.; SCHWINZER R, et al. Cytomegalovirus early promoter induced expression of hCD59 in porcine organs provides protection against hyperacute rejection. **Transplantation**, v.72, p. 1898–906, 2001.

NOJIMA, K.; KWAGUCHI, A.; OHYA, T.; KANNO, S.; HIROBE, M. Studies on photochemical reaction of air pollutants. Identification of nitrophenols in suspended particulates, **Chemical & Pharmaceutical Bulletin** 31 1047–1051, 1983.

ORZOLEK, A.; WYSOCKI, P.; STRZEŻEK, J.; KORDAN, W. Superoxide dismutase (SOD) in boar spermatozoa: Purification, biochemical properties and changes in activity during semen storage (16 °C) in different extenders **Reproductive Biology**, v.13, p. 34 – 40, 2013.

PADALKO, V. I. Uncoupler of oxidative phosphorylation prolongs the lifespan of *Drosophila*. **Biochemistry (Moscow)**, v.70, p. 986 – 989, 2005.

PARASCANDOLA, J. Dinitrophenol and bioenergetics: an historical perspective. **Mol. Cellular Biochemistry**, v. 5, p. 69 – 77, 1974.

PARKS, J.E.; LYNCH, D.V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, v. 29, p. 255–266, 1992.

PARK, Y.I.; REMPEL, W.E.; BOYLAN, W.J.; MAKHAMBERTA, T.P.E. Comparative growth curves of miniature and conventional pigs. **Genetics**, v.83, p.557, 1976.

PLISKO, N. T. Method of prolonging the viability and fertilizing capacity of boar spermatozoa. **Svinovodstvo**, v. 9, p. 37-41, 1965.

PONS-REJRAJI, H.; SION, B.; SAEZ, F.; BRUGNON, F.; JANNY, L.; GRIZARD, G. Role of reactive oxygen species (ROS) on human spermatozoa and male infertility. **Gynécologie Obstétrique & Fertilité**, v.37, p. 529 –535, 2009.

PUGH PM, STONE SL. The effect of 2,4-dinitrophenol and related compounds on bile secretion. **Journal of Physiology** v. 198, p. 39–49, 1968.

PURSEL, V. G.; JOHNSON, L. A. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and new thawing procedure. **Journal Animal Science**, v. 40, p. 99-102, 1975.

RAMSAY, T.G.; MITCHELL, A.D.; RICHARDS, M.P. Uncoupling protein expression in skeletal muscle and adipose tissue in response to *in vivo* porcine somatotropin treatment **Domestic Animal Endocrinology**, v. 35, p. 130–141, 2008.

RHOADES, R; PFLANZER, R. Human Physiology, 3rd edn. Harcourt Brace and company, Orlando. 1996.

RICQUIER, D.; BOUILLAUD, F. The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP, **The Biochemical Journal** v.345,p. 161–179, 2000.

RUTISHAUSER S. C. B. & STONE S. L. The effect of sodium salicylate on bile secretion in the dog. **Journal Physiology**, v. 245, p. 549 565, 1975.

SALEH R.A.; AGARWAL, A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. **Journal of Andrology**, v.23, p. 737–52, 2002.

SANDRIN, M.S.; FODOR, W.L.; MOUHTOURIS, E.; OSMAN, N.; COHNEY, S.; ROLLINS, S.A, et al. Enzymatic remodeling of the carbohydrate surface of a xenogenic cell substantially reduces human antibody binding and complement-mediated lysis. **Nature Medicine**, v.1, p.1261–7, 1995.

SHEA, J.; WEBER, J.; OVERCASH, M. Biological activities of 2, 4-dinitrophenol in plant– soil systems, **Residue Reviews**, v. 87, p. 1–41, 1983.

SCHEID, I.R. Transportando e armazenando corretamente as doses de sêmen. **Suínos & Cia**, v.2, p.25-31, 2003.

SCHRAUWEN, P.; HOEKS, J.; HESSELINK, M.K. Putative function and physiological relevance of the mitochondrial uncoupling protein-3: involvement in fatty acid metabolism? **Progress in Lipid Research** v. 45, p. 17–41, 2006.

SVENSSON, L.T.; ENGBERG, S.T.; AOYAMA, T.; USUDA, N.; ALEXSON, S.E.; HASHIMOTO, T. Molecular cloning and characterization of a mitochondrial peroxisome proliferator induced acyl-CoA thioesterase from rat liver. **Biochemistry Journal** v. 329, p. 601–8, 1998.

SPEAKMAN, J.R.; DARREN, A.; TALBOT, C.S.; SAM, S.; MCLAREN, J.S.; REDMAN, P.; KROL, JACKSON, D.M.; JOHNSON, M.S.; BRAND, M.D. Uncoupled and surviving: individual mice with high metabolism have greater mitochondrial uncoupling and live longer **Aging Cell**, v.3, p.87–95, 2004.

SPURLOCK, M.E.; JI, S.Q.; GODAT, R.L.; KUSKE, J.L.; WILLIS, G.M.; FRANK, G.R., et al. Changes in the expression of uncoupling proteins and lipases in porcine adipose tissue and skeletal muscle during feed deprivation. **The Journal of Nutritional Biochemistry** v. 12, p. 81–7, 2001.

SLATER T. F. & DELANEV V. B. The effect of various drugs and toxic agents on bile flow rate and composition in the rat. **Toxiology applied Pharmacology** v. 20, p. 157-174, 1971.

STOREY, B.T. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v. 3, p. 203–213, 1997.

STRZEZEK, J.; LAPKIEWICZ, S.; LECEWICZ, M. A note on antioxidant capacity of boar seminal plasma. **Animal Science Papers and Reports**, v. 17, p. 181–188, 1999.

STRZEZEK, R.; KOZIOROWSKA-GILUN, M.; KOWALÓWKA, M.; STRZEZEK, J. Characteristics of antioxidant system in dog semen. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v.12, p.55–60, 2009.

SWINDLE, M.M.; SMITH, A.C. Comparative anatomy and physiology of the pig. **Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science** v. 25, p. 11, 1998.

SWINDLE, M.M.; SMITH, A.C.; LABER-LAIRD, K.; DUNGAN, L. Swine in biomedical research: management and models. **ILAR Journal**, v. 36, p. 1-5, 1994.

TAKAHASHI, M.; SUNAGA, M.; HIRATA-KOIZUMI, M.; HIROSE, A.; KAMATA, E.; EMA, M. Reproductive and Developmental Toxicity Screening Study of 2,4-Dinitrophenol in Rats. **Environmental Toxicology** v. 24, p. 74–81, 2009.

THE MERCK INDEX. An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 11th ed. Ed. S. Budavari. Merck and Co. Inc., Rahway, NJ. 1989.

TRAYHURN, P.; TEMPLE, N.J.; VAN AERDE, J. Evidence from immunoblotting studies on uncoupling protein that brown adipose tissue is not present in the domestic pig. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology** v. 67, p. 1480–5, 1989.

USEPA. U.S. Environmental Protection Agency. Assessment Tools for the Evaluation of Risk (ASTER, online database). Environmental Research Laboratory, Duluth, MN. 1993.

van VEENENDAAL, A. ; Baten, A.; Pickkers, P. Surviving a life-threatening 2,4-DN P

intoxication: '*Almost dying to be thin*' **The Netherlands Journal of Medicine**, v. 69, p. 154, 2011.

VISHWANATH, R., PITT, P., SHANNON, P., Sperm numbers, semen age and fertility in fresh and frozen bovine semen. **Proc. N.Z. Society Animal Production**, 56, 31–34, 1996.

VOLKOV, A.G.; DEAMER, D.W.; TANELIAN, D.L.; MARKIN, V.S. *Liquid Interfaces in Chemistry and Biology*, Wiley, 1998.

WASILEWSKA-SAMPAIO, A. P.; SILVEIRA, M. S.; HOLUB, O.; GOECKING, R.; GOMES, F. C. A.; MOURA NETO, V.; LINDEN, R.; FERREIRA, S. T.; DE FELICE, F. G. Neuritogenesis and neuronal differentiation promoted by 2,4-dinitrophenol, a novel anti-amyloidogenic compound. **FASEB J.**, v. 19, p. 1627 – 1636, 2005.

WATSON, P.F. Cooling of spermatozoa and fertilizing capacity. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 31, n.1, p. 135-140, 1996.

WHITACRE, D.M., WARE, G.W. (Eds.), *The Pesticide Book*, 6th ed. Ohio, Meister-Pro Information Resources (Meister Media Worldwide), Willoughby, 2004.

WHITE F.C.; ROTH, D.M.; BLOOR, C.M. The pig as a model for myocardial ischemia and exercise. **Laboratory Animal Science**, v.36,p.351-6, 1986.

WHITERS, P.C. *Comparative Animal Physiology*. Ed. Saunders College Publishing, 1992, 607 pp.

YOSHIDA, M. Conservation of sperms: current status and new trends **Animal Reproduction Science** v. 60–61, p.349–355, 2000.

ZAIDI, A.; SCHMOECKEL, M.; BHATTI, F.; WATERWORTH, P.; TOLAN, M.; COZZI, E, et al. Life supporting pig-to-primate renal xenotransplantation using genetically modified donors. **Transplantation**, v. 65, p.1584–90, 1998.

ZHANG, K.; SHANG, Y.; LIAO, S.; ZHANG, W.; NIAN, H.; LIU, Y.; CHEN, Q.; HAN, C. Uncoupling protein 2 protects testicular germ cells from hyperthermia-induced apoptosis **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.360, p. 327–332, 2007.