



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS  
DA VIDA E DA NATUREZA (ILACVN)**

**BIOTECNOLOGIA - BACHARELADO**

**A PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO 70 (HSP70) PROTEGE OS ESPERMATOZOIDES  
BOVINOS DOS DANOS CAUSADOS PELO ESTRESSE OXIDATIVO**

**LÍVIA PADILHA DA CRUZ**

Foz do Iguaçu  
2025

**A PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO 70 (HSP70) PROTEGE OS ESPERMATOZOIDES  
BOVINOS DOS DANOS CAUSADOS PELO ESTRESSE OXIDATIVO**

**LÍVIA PADILHA DA CRUZ**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Weber Beringui Feitosa

Foz do Iguaçu  
2025

LÍVIA PADILHA DA CRUZ

**A PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO 70 (HSP70) PROTEGE OS ESPERMATOZOIDES BOVINOS DOS DANOS CAUSADOS PELO ESTRESSE OXIDATIVO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Weber Beringui Feitosa  
UNILA

---

Prof. Dr. Cristian Antonio Rojas  
UNILA

---

Mestranda Karen Castillo Quintana  
UNILA

Foz do Iguaçu, 27 de fevereiro de 2025.

## TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor(a): Livia Padilha da Cruz

Curso: Biotecnologia

Tipo de Documento:

- |   |  |
|---|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> graduação | <input type="checkbox"/> artigo                                    |
| <input type="checkbox"/> especialização       | <input checked="" type="checkbox"/> trabalho de conclusão de curso |
| <input type="checkbox"/> mestrado             | <input type="checkbox"/> monografia                                |
| <input type="checkbox"/> doutorado            | <input type="checkbox"/> dissertação                               |
|   | <input type="checkbox"/> tese                                      |
|   | <input type="checkbox"/> CD/DVD – obras audiovisuais               |
|   | <input type="checkbox"/> _____                                     |

Título do trabalho acadêmico: A proteína de choque térmico 70 (hsp70) protege os espermatozoides bovinos dos danos causados pelo estresse oxidativo

Nome do orientador(a): Prof. Dr. Weber Beringui Feitosa

Data da Defesa: 27/02/2025

### Licença não-exclusiva de Distribuição

O referido autor(a):

a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino-Americana – BIUNILA a disponibilizar a obra, gratuitamente e de acordo com a licença pública *Creative Commons Licença 3.0 Unported*.

Foz do Iguaçu, 27 de fevereiro de 2025.

---

Assinatura do Responsável

Dedico este trabalho aos meus pais.  
Sem eles nada seria possível.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Geneci Ribeiro Padilha e Reginaldo Alves da Cruz, por serem uma base sólida enquanto trilhava os caminhos da faculdade. Eles foram a luz que guiava meus passos e a voz que me inspirou a seguir em frente.

À minha família, que sempre esteve ao meu lado, incentivando-me a perseguir os meus sonhos, compreendendo minhas ausências e celebrando comigo cada conquista. Especialmente, expresso minha gratidão à minha avó, Maria Joana Correa Ribeiro, pelo suporte durante os anos que compartilhamos um lar. Ela foi o abraço que me acolhia nos dias difíceis.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Weber Beringui Feitosa, pelo conhecimento transmitido, orientação precisa e paciência ao longo deste trabalho. Sua dedicação e sabedoria foram fundamentais para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

À Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA) pelo ambiente de aprendizagem estimulante, recursos disponíveis e oportunidades oferecidas. Sou grata pela infraestrutura e pelo corpo docente que moldaram meu percurso acadêmico.

Ao Departamento de Laboratórios de Ensino (DELABEN) por tornar possível a organização e funcionamento eficaz dos laboratórios de ensino. A disponibilização de equipamentos e materiais de consumo foi essencial para garantir um ambiente propício ao aprendizado e à pesquisa. Além disso, gostaria de estender um agradecimento especial ao professor Jean por sua orientação e suporte contínuos.

Ao frigorífico Frigobendo, pela doação do material bovino essencial para a realização desta pesquisa. Sem essa valiosa contribuição, este trabalho não teria sido possível. A generosidade e apoio da empresa foram fundamentais para o desenvolvimento deste estudo.

Aos meus colegas de trabalho da Reprodução, Aline Hope, Karen Quintana, Maria Eduarda Catalan, Luis Enrique Martens, Sebastian Márquez e Thais Antunes, por toda ajuda durante a realização dos experimentos do meu TCC. O comprometimento e a parceria de vocês foram essenciais para a condução deste trabalho, tornando cada etapa do processo mais colaborativa e enriquecedora. Sou imensamente grata pelo apoio, pelas trocas de conhecimento e, sobretudo, pelas horas que cada um dedicou para a realização deste estudo.

Aos amigos que a UNILA me proporcionou, por tornarem essa jornada mais leve e inesquecível. As risadas compartilhadas nos momentos de estudo e descontração

fizeram toda a diferença. Em especial, agradeço a Ingrid Leão Perdomo, Isabela Cristina Dal Moro Vargas e Julia Benini dos Santos Cardoso, pela amizade sincera e apoio mútuo.

*A persistência é o caminho do êxito.*  
**Charles Chaplin**

## RESUMO

A HSP70 é uma chaperona essencial para a homeostase celular, especialmente sob estresse oxidativo, condição que compromete funções espermáticas críticas. No entanto, seu papel na resposta do espermatozoide ao estresse oxidativo ainda não está totalmente esclarecido. Este estudo investigou a importância da HSP70 na qualidade espermática bovina sob estresse oxidativo. Para isso, espermatozoides coletados da cauda do epidídimo bovino foram lavados, ressuspensos em TL-STOCK ( $5 \times 10^6$  espermatozoides/mL) e distribuídos em 4 grupos experimentais. (1) Controle, (2) VER (100  $\mu$ M do inibidor de HSP70, VER-155008), (3)  $H_2O_2$  (2%  $H_2O_2$ ) e (4)  $H_2O_2$ + VER (2%  $H_2O_2$ + 100  $\mu$ M VER-155008). Em seguida, os espermatozoides foram incubados por 2 horas a 38,5°C, 5% de  $CO_2$  e alta umidade. Após a incubação, os espermatozoides foram processados para avaliação do estresse oxidativo (CellRox Green; 0,76  $\mu$ M), da atividade mitocondrial (MitoTracker Red CMXRos; 0,76  $\mu$ M) e da integridade da membrana acrossomal (FITC-PSA; 50  $\mu$ g/mL) em microscopia de fluorescência. Os dados foram analisados estatisticamente pelo software SigmaPlot 14.0, com ANOVA seguida pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). O percentual de espermatozoides positivos para estresse oxidativo foi menor no grupo controle ( $16,7 \pm 3,8\%^a$ ) e aumentou progressivamente nos grupos VER ( $30,9 \pm 3,4\%^{ab}$ ),  $H_2O_2$  ( $36,9 \pm 4,2\%^b$ ) e  $H_2O_2$  + VER ( $52,7 \pm 1,7\%^c$ ). A porcentagem de espermatozoides com alta atividade mitocondrial foi significativamente reduzida pela inibição da HSP70 e pelo estresse oxidativo, com  $76,3 \pm 3,6\%^a$  no controle,  $61,6 \pm 3,7\%^b$  no VER,  $60,3 \pm 2,7\%^b$  no  $H_2O_2$  e  $46,9 \pm 4,9\%^c$  no  $H_2O_2$  + VER. A porcentagem de espermatozoides com a membrana acrossomal íntegra seguiu tendência semelhante, sendo maior no controle ( $53,0 \pm 1,0\%^a$ ), comparada ao VER ( $37,7 \pm 0,3\%^b$ ),  $H_2O_2$  ( $36,7 \pm 1,9\%^b$ ) e ao  $H_2O_2$  + VER ( $29,7 \pm 0,9\%^c$ ). Os achados do presente estudo evidenciam o papel central da HSP70 na homeostase espermática, especialmente em condições de estresse oxidativo. A inibição dessa chaperona intensificou significativamente os efeitos deletérios induzidos pelo peróxido de hidrogênio, refletindo-se no aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, na disfunção mitocondrial e na perda da integridade. Esses resultados sugerem que a HSP70 exerce uma função citoprotetora nos espermatozoides, possivelmente mediando mecanismos de defesa celular contra o estresse oxidativo. Diante desses achados, conclui-se que a HSP70 não apenas desempenha um papel fundamental na proteção contra o estresse oxidativo, mas também contribui ativamente para a manutenção da qualidade espermática, regulando aspectos críticos como a atividade mitocondrial e a integridade da membrana acrossomal.

**Palavras-chave:** chaperona; homeostase; atividade mitocondrial; membrana acrossomal; espécies reativas de oxigênio (EROs).

## RESUMEN

HSP70 es una acompañante esencial para la homeostasis celular, especialmente bajo estrés oxidativo, una condición que compromete funciones críticas de los espermatozoides. Sin embargo, aún no se comprende completamente su papel en la respuesta de los espermatozoides al estrés oxidativo. Este estudio investigó la importancia de HSP70 en la calidad de los espermatozoides bovinos bajo estrés oxidativo. Para ello, los espermatozoides recolectados del epidídimo de la cola bovina fueron lavados, resuspendidos en TL-STOCK ( $5 \times 10^6$  espermatozoides/mL) y distribuidos en 4 grupos experimentales. (1) Control, (2) VER (inhibidor de HSP70  $100 \mu\text{M}$ , VER-155008), (3)  $\text{H}_2\text{O}_2$  (2 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y (4)  $\text{H}_2\text{O}_2$  + VER (2 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  +  $100 \mu\text{M}$  VER-155008). Luego, los espermatozoides se incubaron durante 2 horas a  $38,5^\circ\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$  y alta humedad. Después de la incubación, los espermatozoides se procesaron para evaluar el estrés oxidativo (CellRox Green;  $0,76 \mu\text{M}$ ), la actividad mitocondrial (MitoTracker Red CMXRos;  $0,76 \mu\text{M}$ ) y la integridad de la membrana acrosómica (FITC-PSA;  $50 \mu\text{g/mL}$ ) mediante microscopía de fluorescencia. Los datos se analizaron estadísticamente mediante el software SigmaPlot 14.0, con ANOVA seguido de la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ). El porcentaje de espermatozoides positivos para estrés oxidativo fue menor en el grupo control ( $16,7 \pm 3,8\%^a$ ) y aumentó progresivamente en los grupos VER ( $30,9 \pm 3,4\%^{ab}$ ),  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $36,9 \pm 4,2\%^b$ ) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  + VER ( $52,7 \pm 1,7\%^c$ ). El porcentaje de espermatozoides con alta actividad mitocondrial se redujo significativamente por la inhibición de HSP70 y el estrés oxidativo, con  $76,3 \pm 3,6\%^a$  en control,  $61,6 \pm 3,7\%^b$  en VER,  $60,3 \pm 2,7\%^b$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $46,9 \pm 4,9\%^c$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  + VER. El porcentaje de espermatozoides con membrana acrosómica intacta siguió una tendencia similar, siendo mayor en el control ( $53,0 \pm 1,0\%^a$ ), en comparación con VER ( $37,7 \pm 0,3\%^b$ ),  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $36,7 \pm 1,9\%^b$ ) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  + VER ( $29,7 \pm 0,9\%^c$ ). Los hallazgos del presente estudio resaltan el papel central de HSP70 en la homeostasis de los espermatozoides, especialmente en condiciones de estrés oxidativo. La inhibición de esta chaperona intensificó significativamente los efectos nocivos inducidos por el peróxido de hidrógeno, reflejados en el aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno, disfunción mitocondrial y pérdida de integridad. Estos resultados sugieren que HSP70 ejerce una función citoprotectora en los espermatozoides, posiblemente mediando mecanismos de defensa celular contra el estrés oxidativo. Ante estos hallazgos, se concluye que HSP70 no sólo juega un papel fundamental en la protección contra el estrés oxidativo, sino que también contribuye activamente al mantenimiento de la calidad del esperma, regulando aspectos críticos como la actividad mitocondrial y la integridad de la membrana acrosómica.

**Palabras clave:** chaperona; homeostasis; actividad mitocondrial; membrana acrosómica; especies reactivas de oxígeno (EROs).

## ABSTRACT

HSP70 is an essential chaperone for cellular homeostasis, especially under oxidative stress, a condition that compromises critical sperm functions. However, its role in sperm response to oxidative stress is not yet fully understood. This study investigated the importance of HSP70 in bovine sperm quality under oxidative stress. For this purpose, sperm collected from the cauda epididymis were washed, resuspended in TL-STOCK ( $5 \times 10^6$  sperm/mL) and distributed into 4 experimental groups: (1) Control, (2) VER (100  $\mu$ M of the HSP70 inhibitor, VER-155008), (3) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and (4) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + VER (2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 100  $\mu$ M VER-155008). Then, spermatozoa were incubated for 2 hours at 38.5°C, 5% CO<sub>2</sub> and high humidity. After incubation, spermatozoa were processed to evaluate oxidative stress (CellRox Green; 0.76  $\mu$ M), mitochondrial activity (MitoTracker Red CMXRos; 0.76  $\mu$ M) and acrosomal membrane integrity (FITC-PSA; 50  $\mu$ g/mL) by fluorescence microscopy. Data were statistically analyzed using SigmaPlot 14.0 software, with ANOVA followed by Tukey's test ( $p < 0.05$ ). The percentage of sperm positive for oxidative stress was lower in the control group ( $16.7 \pm 3.8\%^a$ ) and increased progressively in the VER ( $30.9 \pm 3.4\%^{ab}$ ), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $36.9 \pm 4.2\%^b$ ) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + VER ( $52.7 \pm 1.7\%^c$ ) groups. The percentage of sperm with high mitochondrial activity was significantly reduced by HSP70 inhibition and oxidative stress, with  $76.3 \pm 3.6\%^a$  in the control,  $61.6 \pm 3.7\%^b$  in VER,  $60.3 \pm 2.7\%^b$  in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and  $46.9 \pm 4.9\%^c$  in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + VER. The percentage of sperm with intact acrosomal membrane followed a similar trend, being higher in the control ( $53.0 \pm 1.0\%^a$ ), compared to VER ( $37.7 \pm 0.3\%^b$ ), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $36.7 \pm 1.9\%^b$ ) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + VER ( $29.7 \pm 0.9\%^c$ ). The findings of the present study highlight the central role of HSP70 in sperm homeostasis, especially under conditions of oxidative stress. Inhibition of this chaperone significantly intensified the deleterious effects induced by hydrogen peroxide, reflected in increased production of reactive oxygen species, mitochondrial dysfunction, and loss of integrity. These results suggest that HSP70 exerts a cytoprotective function in sperm, possibly mediating cellular defense mechanisms against oxidative stress. Given these findings, it is concluded that HSP70 not only plays a fundamental role in protecting against oxidative stress, but also actively contributes to the maintenance of sperm quality, regulating critical aspects such as mitochondrial activity and the integrity of the acrosomal membrane.

**Key words:** chaperone; homeostasis; mitochondrial activity; acrosomal membrane; reactive oxygen species (ROS).

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Fluxograma da espermatogênese .....	18
<b>Figura 2</b> – Principais modificações das espermátides durante a espermiogênese originando um espermatozoide .....	20
<b>Figura 3</b> – Descrição morfológica dos espermatozoides .....	22
<b>Figura 4</b> – Características do espermatozoide em cada porção do epidídimo, sua maturação e modificações durante o trânsito epididimário .....	23
<b>Figura 5</b> – Interação entre o espermatozoide e o oócito na fecundação .....	25
<b>Figura 6</b> – Efeitos das EROs na qualidade espermática .....	26
<b>Figura 7</b> – Superprodução de EROs .....	27
<b>Figura 8</b> – Padrão de fluorescência emitida pela sonda CellRox Green em espermatozoides bovinos com alto ou baixo nível de estresse .....	40
<b>Figura 9</b> – Padrão de fluorescência emitida pela sonda MitoTracker em espermatozoides bovinos com alta e baixa atividade mitocondrial .....	43
<b>Figura 10</b> – Padrão de fluorescência emitida pela sonda FITC-PSA em espermatozoides bovinos com membrana acrossomal íntegra ou reagida.....	46

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> – Efeito da inibição da HSP70 e do estresse oxidativo induzido por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> na produção de espécies reativas de oxigênio em espermatozoides bovinos .....	42
<b>Gráfico 2</b> – Influência da HSP70 e do estresse oxidativo na manutenção da atividade mitocondrial espermática .....	45
<b>Gráfico 3</b> – Efeito da inibição da HSP70 e do estresse oxidativo na disfunção mitocondrial espermática .....	45
<b>Gráfico 4</b> – Papel da HSP70 na preservação da integridade acrossomal em espermatozoides expostos ao estresse oxidativo .....	47
<b>Gráfico 5</b> – Reação acrossomal em espermatozoides bovinos tratado com H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> e com inibidor da HSP70.....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GC	Gota Citoplasmática
HSPs	Proteínas de Choque Térmico
HSP70	do inglês: Heat Shock Protein 70
PSA	Propil Sulfanato de Amina
ZP	Zona Pelúcida

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>18</b>
2.1.	ESPERMATOGÊNESE E MATURAÇÃO ESPERMÁTICA.....	18
2.2.	EQUILÍBRIO REDOX NO ESPERMATOZOIDE .....	26
2.3.	IMPACTO DO ESTRESSE OXIDATIVO NO EMBRIÃO .....	28
2.4.	CHAPERONAS MOLECULARES .....	29
2.5.	HSP70 .....	30
2.6.	SONDAS FLUORESCENTES .....	31
2.6.1.	CellROX® Green Reagent® .....	31
2.6.2.	MitoTracker Red .....	32
2.6.3.	FITC-PSA .....	33
<b>3.</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>34</b>
<b>4.</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	<b>35</b>
<b>5.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>36</b>
5.1.	OBJETIVO GERAL.....	36
5.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	36
<b>6.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
6.1.	COLETA DE TESTÍCULOS BOVINOS .....	37
6.2.	COLETA DE ESPERMATOZOIDES .....	37
6.3.	INCUBAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES .....	37
6.4.	AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO .....	38
6.5.	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL .....	38
6.6.	AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DE MEMBRANA ACROSSOMAL .....	38
6.7.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>40</b>
7.1.	AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO .....	40
7.2.	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL .....	42
7.3.	AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DE MEMBRANA ACROSSOMAL .....	46
<b>8.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>50</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>51</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os espermatozoides, gametas masculinos, são formados dentro dos túbulos seminíferos dos testículos, envolvendo uma série de eventos celulares de mitoses e meioses em um processo denominado espermatogênese. Este processo contém estágios celulares sucessivos, através dos quais as espermatogônias, derivadas das células germinativas primordiais, se diferenciam em espermatócitos, posteriormente em espermátides e, por fim, em espermatozoides. Após sua formação nos túbulos seminíferos, ainda são necessários dois processos maturacionais extratesticulares para que os espermatozoides ganhem capacidade fertilizante: a maturação no epidídimo e a capacitação no trato reprodutor feminino. Assim, os espermatozoides recém formados presentes nos túbulos seminíferos são transportados para o epidídimo, onde serão maturados e armazenados até sua liberação no momento da ejaculação (FERREIRA *et al.*, 2023).

Durante a espermatogênese, é necessário manter o equilíbrio redox para garantir a viabilidade e a funcionalidade dos espermatozoides. O desequilíbrio entre oxidação e redução, ocasionado pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou pela falha na atividade antioxidante, desencadeia o estresse oxidativo, que pode prejudicar a função espermática. Além disso, pode resultar em danos ao DNA, peroxidação lipídica, comprometimento da integridade da membrana plasmática e acrossomal, aumento da permeabilidade da membrana, inativação de enzimas celulares e indução da morte celular programada dos espermatozoides e das células germinativas, prejudicando a espermatogênese e a fertilidade masculina (KOWALCZYK, 2022; RIVERA-CONCHA *et al.*, 2024; SANTOS *et al.*, 2022; SHAHAT *et al.*, 2020).

Dentre os mecanismos celulares envolvidos na resposta ao estresse oxidativo, destacam-se as proteínas de choque térmico (HSPs), uma família de chaperonas moleculares essenciais para a manutenção da homeostase celular. Entre elas, a HSP70 (Heat Shock Protein 70) é uma das chaperonas mais estudadas, reconhecida por sua capacidade em promover a qualidade celular sob condições adversas. Essa proteína desempenha um papel crucial na proteção celular, atuando na estabilização e no reparo de proteínas danificadas e na homeostase proteica, além de modular respostas antioxidantes (RADMANESH *et al.*, 2021). Sua expressão pode ser induzida por condições adversas, como o aumento das EROs, e tem sido associada à proteção da integridade espermática e ao suporte da espermatogênese (MADAEVA *et al.*, 2020). Estratégias que promovem a

regulação da HSP70, aliadas a antioxidantes naturais e sintéticos, vêm sendo estudadas como potenciais abordagens para mitigar os efeitos deletérios do estresse oxidativo sobre a fertilidade bovina (GUALTIERI *et al.*, 2021).

Dessa forma, considerando o papel fundamental da HSP70 na manutenção da homeostase celular e na proteção contra os danos causados pelo estresse oxidativo, o presente estudo tem como objetivo avaliar a importância desta chaperona em espermatozoides bovinos. O estudo dos mecanismos envolvidos na resposta ao estresse oxidativo poderá contribuir para uma melhor compreensão dos fatores que influenciam a qualidade espermática e, conseqüentemente, a eficiência reprodutiva bovina.

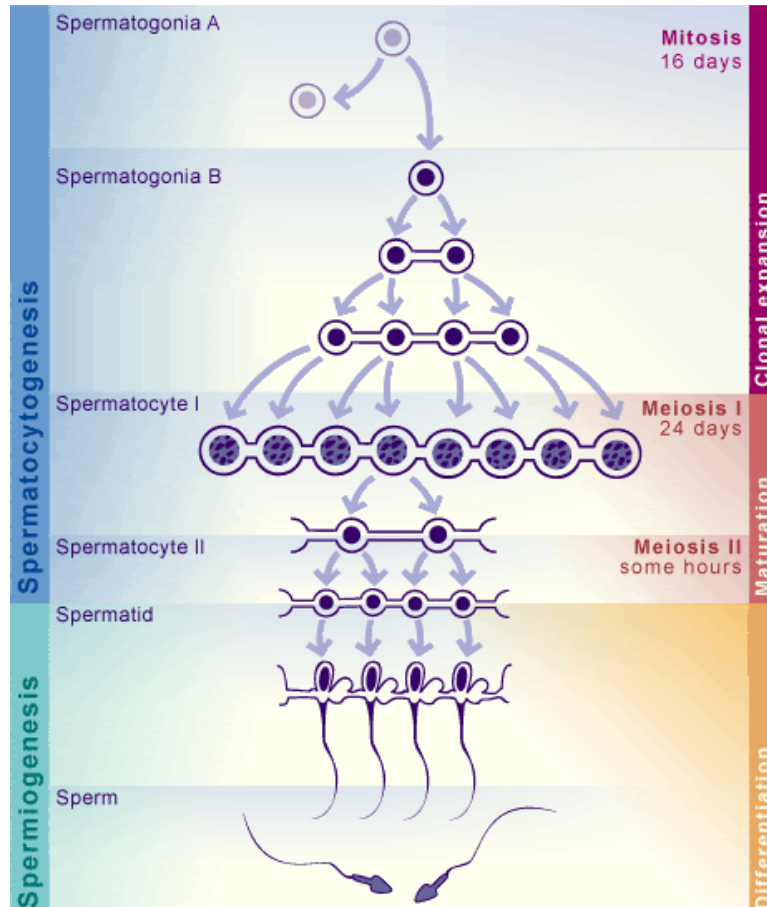
## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. ESPERMATOGÊNESE E MATURAÇÃO ESPERMÁTICA

O testículo desempenha duas funções distintas, uma endócrina e uma exócrina. A função endócrina é desempenhada pelas células de Leydig que estão localizadas no compartimento intersticial, fora dos túbulos, e são responsáveis pela síntese de esteroides. A função exócrina, conhecida como espermatogênese, envolve a produção e a diferenciação de espermatozoides, os quais são liberados no lúmen dos túbulos seminíferos e subsequentemente armazenados no epidídimo (STAUB & JOHNSON, 2018).

A espermatogênese é um processo biológico complexo de multiplicação e diferenciação de células germinativas que leva à produção de gametas masculinos, os espermatozoides. Esse processo é subdividido em três fases cruciais: espermatocitogênese, meiose e espermiogênese, como ilustrado na Figura 1 (CELIO *et al.*, 2025).

**Figura 1 – Fluxograma da espermatogênese**



Fonte: CELIO *et al.*, 2025.

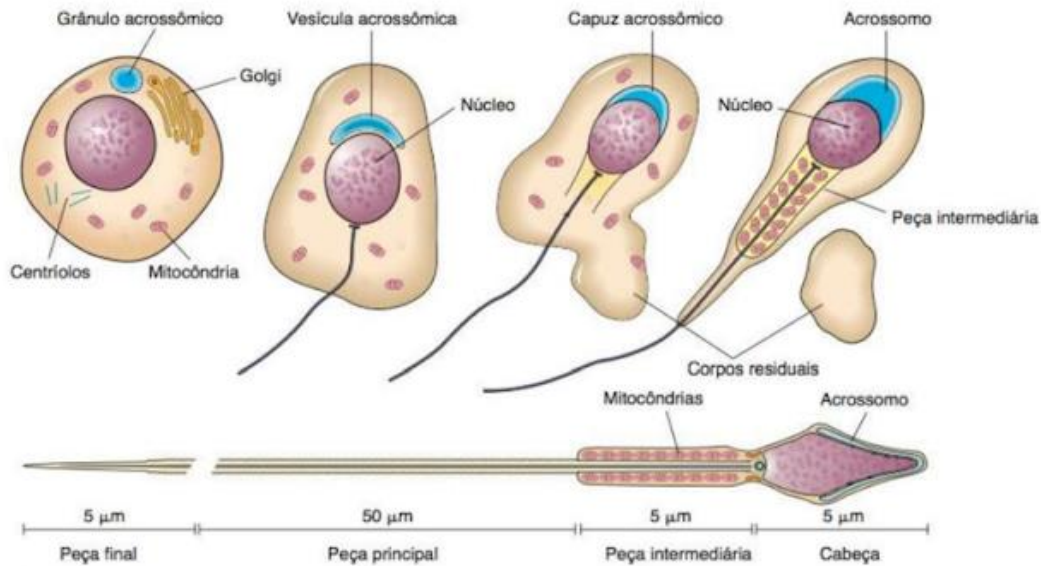
Durante a espermatocitogênese, também chamada de mitose ou fase proliferativa ou de multiplicação, as células germinativas participam do processo espermatogênético realizando divisões mitóticas na parede dos túbulos seminíferos que geram espermatogônias ( $2n$ ). Uma vez que a célula se divide, ela abandona o estado de reserva e começa um processo de diferenciação. As células de Sertoli, localizadas ao redor dos túbulos seminíferos, são responsáveis pela nutrição e pela sustentação das espermatogônias. Esse processo é relativamente lento até a puberdade e, após esse período, torna-se intensivo, onde a fase de multiplicação pode ocorrer ao longo de toda a vida do homem (DA SILVA, 2020).

Durante a espermatogênese, as divisões mitóticas aumentam o rendimento do processo, renovando a população de células-tronco (espermatogônias do tipo A) e gerando as espermatogônias do tipo B, que estão comprometidas com a diferenciação. À medida que as espermatogônias B crescem e aumentam de tamanho, elas se transformam em espermatócitos primários (ou espermatócitos I,  $2n$ ), iniciando a fase de maturação via meiose (DA SILVA, 2020; STAUB & JOHNSON, 2018). Na primeira divisão meiótica (meiose I), cada espermatócito primário produz duas células-filhas haploides ( $n$ ), denominadas espermatócitos secundários (ou espermatócitos II). Em seguida, na segunda divisão meiótica (meiose II), cada espermatócito secundário gera quatro espermátides haploides ( $n$ ) (DA SILVA, 2020). Em resumo, a meiose envolve a duplicação e troca de material genético seguida por duas divisões celulares que reduzem pela metade o número de cromossomos, resultando na formação de quatro espermátides. Ressalta-se que os espermatócitos secundários, embora possuam metade do número normal de cromossomos, ainda retêm a mesma quantidade de DNA devido à duplicação cromossômica, enquanto as espermátides, formadas após a segunda divisão, contêm metade dos cromossomos sem duplicação, caracterizando o estado haploide (DA SILVA, 2020; STAUB & JOHNSON, 2018).

Por fim, na espermiogênese (Figura 2), também chamada de fase de diferenciação, as espermátides sofrem complexos processos nucleares, citoplasmáticas e morfológicas, que resultam na formação dos espermatozoides maduros, os quais são liberados no lúmen dos túbulos seminíferos (STAUB & JOHNSON, 2018). Algumas dessas mudanças incluem a condensação do material nuclear para formação de um núcleo plano e denso, a eliminação do citoplasma para a constituição de uma célula pequena, a formação de uma estrutura especializada denominada acrossomo que contém conteúdo proteolítico, e a formação da peça intermediária que contém as mitocôndrias e da cauda (flagelo) do

espermatozoide (ALCÂNTARA & TONIOLLI, 2023; DA SILVA, 2020).

**Figura 2** – Principais modificações das espermátides durante a espermiogênese originando um espermatozoide



Fonte: ALCÂNTARA & TONIOLLI, 2023.

O processo de espermiogênese é subdividido em três fases: de Golgi, acrossômica e maturação. Durante a fase de Golgi, o desenvolvimento do acrossomo é iniciado pela fusão dos grânulos produzidos pelo complexo de Golgi. Esses grânulos, denominados PAS-positivos ou pró-acrossômicos, unem-se uns aos outros aderindo-se ao envelope nuclear dentro de uma vesícula que é formada e delimitada por uma fina membrana de parede dupla, conhecida como vesícula acrossômica. Os centríolos presentes no citoplasma migram para a direção oposta da vesícula, aproximando-se da superfície celular e iniciando a formação do axonema. Este, por sua vez, consiste em um conjunto de microtúbulos responsáveis pela formação do eixo central do flagelo (ALCÂNTARA & TONIOLLI, 2023).

A segunda fase é a acrossômica, caracterizada pela significativa modificação do núcleo, acrossomo e cauda das espermátides. Durante esse processo, a vesícula e o grânulo acrossômico deslocam-se para a porção anterior do núcleo, formando uma estrutura em formato de capuz denominada acrossomo, estrutura que produz enzimas capazes de dissociar as células da corona radiata e de digerir a zona pelúcida. Essas alterações são facilitadas pela rotação da espermátide, permitindo que o acrossomo se desloque em direção à porção externa do túbulo seminífero, enquanto a cauda alongada

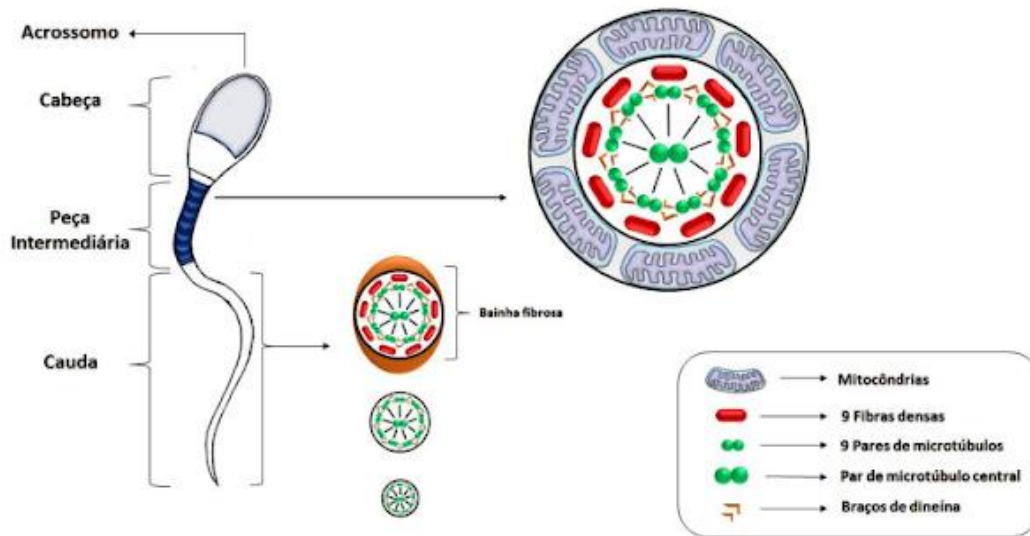
se move em direção ao lúmen (ALCÂNTARA; TONIOLLI, 2023).

Na fase final da espermiogênese, denominada fase de maturação, as espermatídes são transformadas em espermatozoides maduros, os quais são posteriormente liberados no lúmen dos túbulos seminíferos. Nesta etapa, ocorrem diversas alterações morfológicas que preparam as espermatídes para a sua função reprodutiva. O acrossomo totalmente diferenciado migra para o pólo anterior e o excesso de citoplasma é expelido das espermatídes na forma de corpos residuais (LU *et al.*, 2017). Esses corpos residuais são resultados da divisão incompleta das células germinativas durante a espermatocitogênese, sendo conectados por um filamento de citoplasma a outros corpos residuais. Com a eliminação dos corpos residuais, a ponte citoplasmática que ligava as espermatídes se rompe, tornando-as independentes umas das outras e possibilitando seu desenvolvimento em espermatozoides. Durante essa fase, os espermatozoides perdem a maioria das organelas não essenciais, como forma de adaptação à sua função especializada na fecundação. Esses corpos residuais são fagocitados pelas células de Sertoli, marcando assim o término da maturação e a liberação dos espermatozoides maduros (ALCÂNTARA & TONIOLLI, 2023; STAUB & JOHNSON, 2018).

As células de Sertoli também desempenham um papel importante na produção de hormônios, como estrógenos e inibina, que influenciam a hipófise para regular a secreção das gonadotropinas que são responsáveis pelo controle da espermatogênese. Adicionalmente, as células de Leydig, são igualmente essenciais para a espermatogênese, uma vez que produzem testosterona, responsável por estimular e manter o processo espermatogênico, além de servir como substrato para as células de Sertoli na produção de estrógenos por meio da aromatização (DA SILVA, 2020).

Os espermatozoides maduros são células alongadas, morfologicamente divididas em cabeça e cauda (flagelo), unidas pela região do colo e recobertas pela membrana plasmática (Figura 3). A cabeça possui formato arredondado e achatado, contendo o núcleo, o acrossomo na porção superior, uma pequena quantidade de citoplasma e é subdividida em região acrossomal, segmento equatorial e região pós-acrossomal. A cauda, responsável pela motilidade celular, é composta pelo colo, peça intermediária que abriga as mitocôndrias dispostas de forma helicoidal, peça principal e peça terminal, abrigando o axonema, estrutura essencial para o movimento flagelar. Ele é formado por  $\alpha$  e  $\beta$ -tubulina organizados em um par de microtúbulos centrais rodeado por nove microtúbulos periféricos, interligados por braços de dineína, além de fibras densas exteriores, bainha fibrosa (ARAUJO *et al.*, 2017; FERREIRA *et al.*, 2023).

**Figura 3 – Descrição morfológica dos espermatozoides**



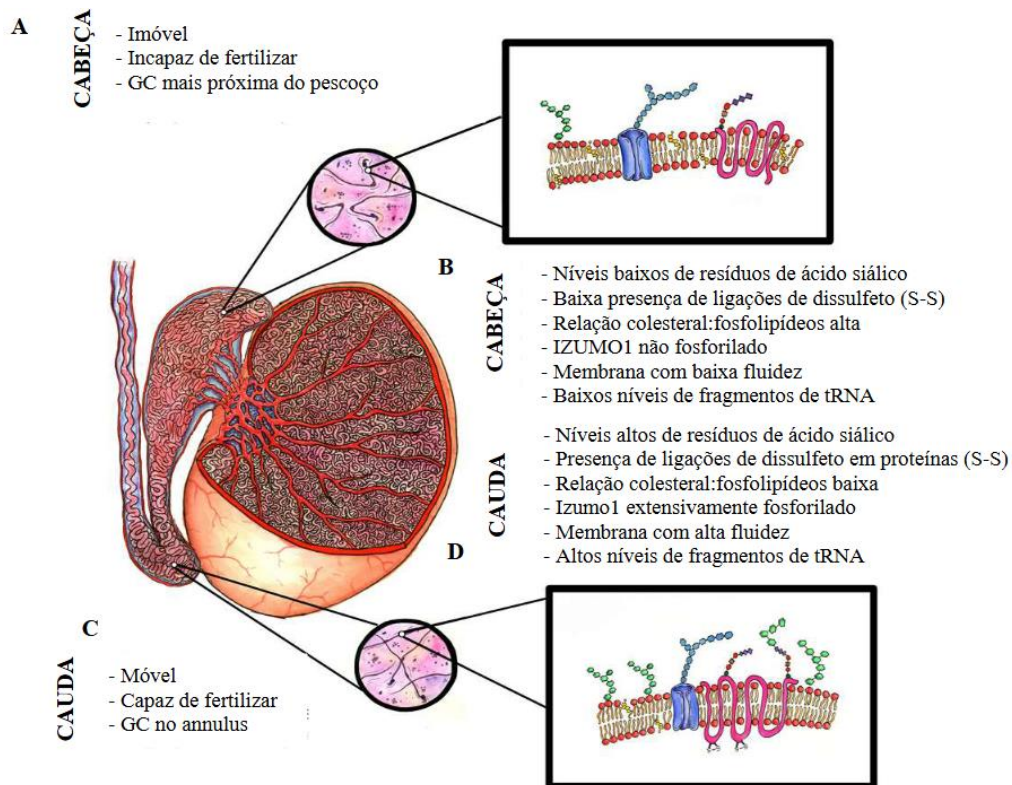
Fonte: ARAUJO *et al.*, 2017.

Após sua formação nos túbulos seminíferos testiculares, os espermatozoides recém-formados são transportados para o epidídimo, onde passam pelo processo de maturação espermática (FERREIRA *et al.*, 2023).

O epidídimo é um órgão do trato reprodutor masculino responsável por fornecer um ambiente que promove a transformação funcional e armazenamento das células espermáticas (TRAJANO, 2022). Anatomicamente, o epidídimo é altamente especializado, composto por um ducto único, longo e contorcido, com septos de tecido conjuntivo que são projetados para o interior do órgão, dividindo-o em segmentos (SOUZA, 2020). Cada segmento do epidídimo (cabeça, corpo e cauda) apresenta características distintas, com expressão diferenciada de genes e concentrações de íons luminiais específicas, essenciais para regular as etapas de maturação dos espermatozoides (FERREIRA *et al.*, 2023).

Durante a maturação espermática, ocorrem importantes alterações morfológicas e fisiológicas nos espermatozoides, envolvendo mudanças sequenciais na composição bioquímica da célula espermática (Figura 4). Esse processo, que se inicia na cabeça do epidídimo e segue pelo corpo até a cauda proximal, é essencial para que os espermatozoides sejam aptos a reconhecer e fecundar os oócitos no trato reprodutor feminino. A maturação também permite que os espermatozoides adquiram motilidade progressiva, além de um potencial para sobrevivência e sucesso na fecundação (GADELLA, 2017).

**Figura 4 –** Características do espermatozoide em cada porção do epidídimo, sua maturação e modificações durante o trânsito epididimário



Fonte: FERREIRA *et al.*, 2023.

Na cabeça do epidídimo, acontece a reabsorção da maioria dos fluidos provenientes dos túbulos seminíferos, além do início da migração da gota citoplasmática (GC), que ocorre da região proximal para a distal do espermatozoide. A GC é um remanescente de citoplasma de células germinativas, cuja migração é uma das alterações morfológicas mais visíveis. Os espermatozoides ejaculados não possuem a GC e sua presença no ejaculado pode afetar a fertilidade espermática em animais que apresentam esse remanescente citoplasmático (FERREIRA *et al.*, 2023; SOARES & NEVES, 2020).

Já no corpo do epidídimo, ocorre parte da migração da GC, a aquisição da capacidade de se ligar à zona pelúcida do oócito e a ativação da cascata de fosforilação da proteína tirosina. Esse processo desencadeia movimentos vibratórios nos espermatozoides. Além disso, ocorre a condensação final da cromatina, que envolve a reticulação das protaminas e a diminuição da água remanescente do processo de espermatogênese, aumentando a compactação da cromatina (FERREIRA *et al.*, 2023). A cauda do epidídimo atua como reservatório onde os espermatozoides são armazenados e mantidos viáveis até a ejaculação, ou gradualmente fagocitados sem a ejaculação (CUNHA,

2019).

Durante a passagem pelo epidídimo, o fluido que envolve os espermatozoides sofre alterações substanciais na composição, incluindo mudanças na osmolaridade, proporção iônica, reservas energéticas e tipos proteicos. As membranas dos espermatozoides também sofrem modificações, como alterações nas composições macromoleculares e fluidez, além da estabilização da cromatina nuclear por aumento nas ligações dissulfídicas. Essas alterações nas membranas são mediadas por proteínas secretadas em regiões específicas do ducto epididimário. O transporte por este ducto depende da contração muscular, dos cílios nas células epiteliais e do gradiente de pressão hidrostática. Essa regulação garante um tempo adequado para a maturação espermática (DE OLIVA *et al.*, 2009).

No decorrer da maturação, ocorre a adsorção de proteínas e glicoproteínas do epitélio epididimário pela membrana espermática, ao mesmo tempo em que ocorre a remoção de proteínas da membrana espermática. Estas mudanças são fundamentais para conferir aos espermatozoides mobilidade e capacidade fecundante. A formação e manutenção de um microambiente especializado no epidídimo também envolve regulação complexa da expressão gênica. Genes específicos ao longo do epidídimo contribuem para o entendimento das bases moleculares da formação dos espermatozoides e das características do ducto epididimário, fundamentais para a maturação espermática e a fertilidade masculina (DE OLIVA *et al.*, 2009).

Após a ejaculação, os espermatozoides são liberados para o meio externo. No entanto, eles ainda não possuem plena habilidade de fecundar os oócitos, mesmo que sejam morfologicamente maduros e dotados de motilidade. Assim, é necessário que permaneçam no trato reprodutivo da fêmea por um período para se tornarem aptos à fecundação. Durante esse tempo, ocorre a capacitação espermática, um processo vital para conferir-lhes competência para a fecundação (FERREIRA *et al.*, 2023).

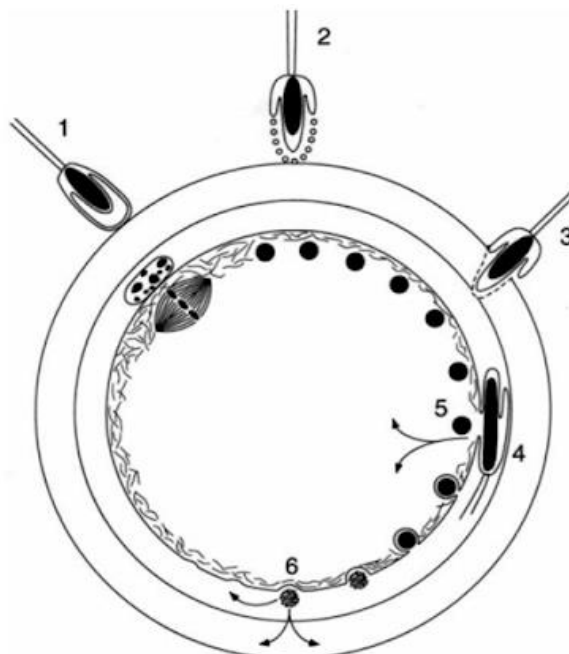
A capacitação espermática envolve uma combinação de eventos bioquímicos e moleculares que ocorrem de forma sequencial e paralela, tanto na cabeça quanto no flagelo dos espermatozoides. Este processo confere-lhes capacidade de hiperativação da motilidade, interação com a zona pelúcida do oócito, reação acrossomal e fusão com a membrana plasmática do oócito na fecundação (CELEGHINI *et al.*, 2023; FERREIRA *et al.*, 2023).

Esse processo ocorre no oviduto que proporciona um microambiente adequado para o transporte, armazenamento, capacitação dos espermatozoides e

fecundação. Ao término do processo, a membrana plasmática apical da cabeça do espermatozoide torna-se fusogênica, permitindo a união entre os gametas e a transferência do material genético masculino no interior do oócito. Os eventos tardios da capacitação espermática ocorrem sob rigoroso controle, uma vez que é um processo irreversível. Se ocorrer a desestabilização da membrana espermática na ausência do oócito, inevitavelmente, ocorrerá a morte do espermatozoide. No oviduto também ocorre a hiperativação do espermatozoide, processo que ocorre em duas fases: a fase rápida, que envolve a ativação dos flagelos desencadeando um movimento vigoroso, e a fase lenta, que implica mudanças nos padrões de movimento do espermatozoide (FERREIRA *et al.*, 2023).

A fecundação culmina na transferência do material genético paterno e na ativação do oócito. Como esquematizado na Figura 5, em (1) ocorre a ligação do espermatozoide à zona pelúcida; (2) observa-se a reação acrossômica; (3) penetração do espermatozoide através da zona pelúcida (ZP); (4) ligação e fusão do espermatozoide com a oolema; (5) ativação do oócito por fatores do citosol espermático (fosfolipase zeta); (6) excitose dos grânulos corticais, promovendo o bloqueio da poliespermia (FERREIRA *et al.*, 2023).

**Figura 5** – Interação entre o espermatozoide e o oócito na fecundação



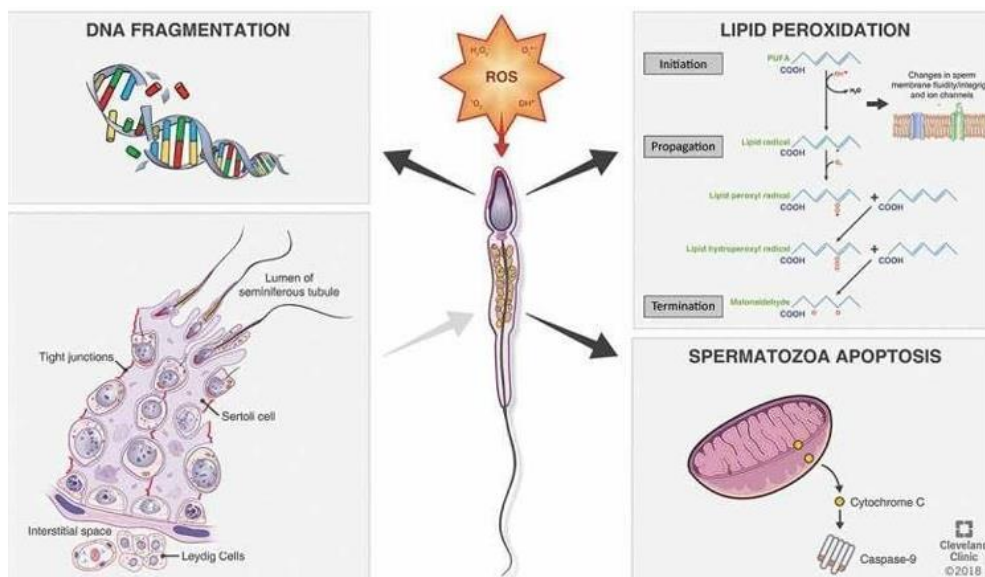
Fonte: FERREIRA *et al.*, 2023.

## 2.2. EQUILÍBRIO REDOX NO ESPERMATOZOIDE

Durante a espermatogênese, o equilíbrio redox é essencial para garantir a viabilidade e a funcionalidade dos espermatozoides. Esse equilíbrio, que envolve a interação entre reações de oxidação e redução, regula o ambiente intracelular e assegura o bom funcionamento das células espermáticas (KOWALCZYK, 2022). O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade antioxidante celular, o que pode afetar a estrutura e a função dos espermatozoides, alterando a qualidade do sêmen (PARECE, 2022).

Embora as EROs sejam subprodutos naturais do metabolismo e desempenhem papéis importantes, como na sinalização celular e homeostase, sua concentração precisa ser cuidadosamente controlada. Quando presentes em níveis fisiológicos adequados, as EROs são essenciais para funções espermáticas, como a reação acrossômica, a capacitação e a fusão espermatozoide-oócito. No entanto, o aumento excessivo dessas moléculas pode resultar na formação de radicais livres, como superóxidos ( $O_2^-$ ), hidroperóxido ( $HO_2$ ), hidroxila ( $OH$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), que são prejudiciais às células, podendo levar a danos irreversíveis (TONIOLLI, 2017). Quando as EROs não são devidamente reguladas, elas podem afetar diversos componentes celulares, incluindo lipídios, proteínas e DNA (Figura 6), alterando as vias de sinalização e o controle redox, o que compromete a função celular e contribui para diversas patologias (DE PAULA JUNIOR & SIQUEIRA, 2025).

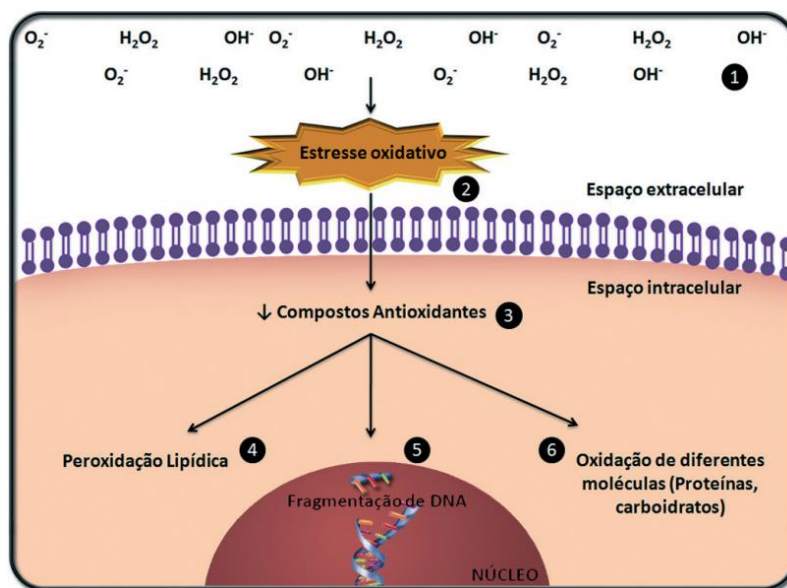
**Figura 6 – Efeitos das EROs na qualidade espermática**



Fonte: SOUZA, 2020.

De maneira esquemática (Figura 7), a superprodução de EROs (1) leva a um aumento significativo de radicais livres na célula, resultando em estresse oxidativo (2). Esse desequilíbrio é causado pela redução dos compostos antioxidantes intracelulares (3), responsáveis pela neutralização das EROs. Com a diminuição da capacidade antioxidante, as EROs promovem peroxidação lipídica (4), afetando as membranas celulares e comprometendo sua funcionalidade. Além disso, as EROs podem causar fragmentação do DNA (5), prejudicando a integridade genética da célula (LUZ *et al.*, 2011).

**Figura 7 – Superprodução de EROs**



Fonte: LUZ *et al.*, 2011.

Os espermatozoides são particularmente suscetíveis ao estresse oxidativo devido aos baixos níveis de antioxidantes enzimáticos e à reduzida capacidade de neutralização de EROs no citoplasma (KOWALCZYK, 2022). Além disso, como células altamente especializadas e não divisíveis, os espermatozoides possuem organelas específicas, mas não realizam transcrição ou tradução de proteínas. A ausência desses mecanismos impede a resposta adaptativa a estresses ambientais, tornando-os ainda mais vulneráveis a danos oxidativos. Dessa forma, a manutenção de um ambiente balanceado é essencial para preservar sua integridade funcional e reprodutiva (JOHNSTON *et al.*, 2022).

O equilíbrio redox adequado é fundamental para garantir a integridade do DNA, a motilidade e a capacidade fertilizante dos espermatozoides ao longo de sua jornada desde a espermatogênese até a fecundação (KOWALCZYK, 2022). Durante esse percurso,

mudanças no microambiente podem levar ao estresse oxidativo, como ocorre no processo de capacitação espermática, em que a peroxidação lipídica danifica as membranas celulares, reduzindo sua estabilidade e funcionalidade. Esse fenômeno compromete a motilidade espermática, promove danos ao DNA e pode culminar no apoptose celular (KURKOWSKA *et al.*, 2020).

A vulnerabilidade dos espermatozoides ao estresse oxidativo também se deve à alta concentração de ácidos graxos poli-insaturados em suas membranas, tornando-os propensos a danos estruturais. Esses danos podem atingir o axonema, reduzindo a motilidade e aumentando os defeitos morfológicos (KURKOWSKA *et al.*, 2020). Além disso, a peroxidação lipídica pode afetar a integridade da membrana acrossomal, interferindo na exocitose de enzimas essenciais para a reação acrossômica e, conseqüentemente, na fusão com o oócito (AGARWAL *et al.*, 2008). Outro impacto significativo do estresse oxidativo nos espermatozoides é observado durante o desenvolvimento embrionário subsequente à fecundação, afetando negativamente as clivagens embrionária e prejudicando conseqüentemente a formação do blastocisto (CASTRO, 2014).

### 2.3. IMPACTO DO ESTRESSE OXIDATIVO ESPERMÁTICO NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

O estresse oxidativo pode resultar em danos ao DNA, comprometendo o potencial de fecundação dos espermatozoides (DA COSTA & STREIT JR, 2019) e prejudicando a contribuição do material genético paterno para o desenvolvimento do embrião (ARAUJO *et al.*, 2017). Como conseqüências negativas, esses danos podem ocasionar atrasos na desmetilação do DNA, mosaicismos e clivagem heterogênea, além de falhas na replicação do DNA, comprometendo a integridade genômica dos embriões, podendo culminar em aborto embrionário e mutações genéticas (DELUAO *et al.*, 2022).

Sob o efeito de estresse oxidativo, o espermatozoide pode enfrentar dificuldades para fecundar o oócito, levando à não formação ou à formação de um embrião não viável. Uma vez fecundado, se o espermatozoide estiver sujeito ao estresse oxidativo, o impacto no embrião pode ser significativo, podendo apresentar danos genéticos que comprometem seu desenvolvimento saudável, resultando em atrasos na desmetilação do DNA, clivagem heterogênea e até aborto embrionário (DELUAO *et al.*, 2022).

A metilação do DNA é essencial na regulação epigenética do desenvolvimento embrionário em mamíferos. Após a fecundação, o oócito e o

espermatozoide fundem-se, formando o zigoto. Nos estágios iniciais do embrião, ocorre a reprogramação epigenética do genoma paterno e materno para restabelecer o estado totipotente do epigenoma gamético. Isso inclui a remetilação do DNA em todo o genoma, exceto em loci específicos (WYCK *et al.*, 2018).

O espermatozoide carrega marcas epigenéticas, como padrões de metilação do DNA e modificações em histonas, que são essenciais para a reprogramação do genoma embrionário e o desenvolvimento adequado da placenta. A ativação do genoma paterno após a fecundação desempenha um papel crucial na diferenciação e invasão do trofoblasto (tecido precursor da placenta), assim como na remodelação e desenvolvimento dos vasos uterinos e da placenta. Por sua vez, espermatozoides com altos níveis de estresse oxidativo podem levar a um desenvolvimento placentário deficiente, impactando a vascularização e a função trofoblástica (LINS *et al.*, 2017).

#### 2.4. CHAPERONAS MOLECULARES

Apesar das características celulares que conferem ao espermatozoide maior propensão em sofrer estresse oxidativo, eles não são totalmente desprovidos de mecanismos de defesa. Várias chaperonas já foram identificadas em espermatozoides de diferentes espécies (BIRBO *et al.*, 2021).

Na década de 1960, o cientista italiano Ferruccio Ritossa descobriu a resposta ao choque térmico ao observar um inchaço característico nos cromossomos de moscas da fruta que foram deixadas involuntariamente em um ambiente de alta temperatura. Ritossa atribuiu esse inchaço ao aumento na expressão de proteínas específicas, resultado da ativação genética em resposta ao estresse térmico (RITOSSA, 1996).

As proteínas de choque térmico (HSPs), ou chaperonas moleculares, foram então descobertas e tornaram-se foco de estudo por serem onipresentes, encontradas em todos os organismos e por funcionarem como acompanhantes, ajudando na reparação e no dobramento correto das proteínas clientes. As HSPs também têm um papel importante no transporte intracelular de proteínas dentro do citosol, retículo endoplasmático e mitocôndrias. Ao fazer isso, elas protegem as células dos efeitos nocivos do calor e de outros estresses (BIRBO *et al.*, 2021).

As HSPs são uma grande família de proteínas estruturalmente diversas que são expressas em todos os tipos de células (AEENI *et al.*, 2021). Elas são classificadas

conforme a massa molecular de seu monômero, variando de 10 a mais de 100 kDa, assim como sua estrutura e função (BIRBO *et al.*, 2021). Esta família abrange 20 membros distintos de proteínas. Além de desempenhar um papel significativo no metabolismo, crescimento, diferenciação e apoptose, as HSPs também estão envolvidas em processos epigenéticos relacionados à condensação da cromatina nuclear (AEENI *et al.*, 2021).

Por conseguirem interagir com várias proteínas, as chaperonas moleculares desempenham funções vitais na homeostase celular. Esta classe de proteínas está envolvida em diversos processos dentro da célula, incluindo estabilização de proteínas recém-sintetizadas, promoção de transporte e translocação de macromoléculas, assistência no enovelamento e no reenovelamento proteico, prevenção da agregação de polipeptídios, entre outras funções (ALMEIDA, 2014).

## 2.5. HSP70

Entre as chaperonas identificadas, a HSP70 desempenha um papel fundamental na resposta ao estresse oxidativo, sendo um componente central na manutenção da proteostase. Também é importante para reparar os danos causados por diferentes tipos de estresse, incluindo o estresse oxidativo. Essa proteína é altamente conservada e amplamente distribuída em organismos, exceto algumas *Archaeas* (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ & VALPUESTA, 2018; ZHANG *et al.*, 2022).

A HSP70 é uma proteína multifuncional que participa de uma variedade de processos relacionados ao controle de qualidade proteica, incluindo dobramento de proteínas de *novo*, redobramento de proteínas mal dobradas, transporte de proteínas, montagem e desmontagem de complexos proteicos, prevenção de agregação de proteínas, solubilização de proteínas agregadas. Além disso, a HSP70 também está envolvido na translocação de proteínas através membranas, regulando a atividade proteica, cooperando com acompanhantes e cooperando com a maquinaria de degradação celular (ZHANG *et al.*, 2022).

Os membros da HSP70 não apenas desempenham funções intracelulares essenciais para promover a maturação das proteínas alvo e ajustar sua atividade em diferentes processos celulares, mas também atuam na proteção das células contra a interrupção da homeostase proteica causada por estresses proteotóxicos, condições fisiopatológicas e envelhecimento do organismo (ZHANG *et al.*, 2022).

Durante a espermatogênese e a maturação espermática, a HSP70 auxilia

no dobramento adequado de proteínas, na estabilização de polipeptídeos recém-sintetizados e na prevenção da agregação proteica em condições adversas (DUN 1 *et al.*, 2012). Estudos identificaram a presença da HSP70 em espermatozoides de mamíferos, incluindo humanos (*Homo sapiens*), bovinos (*Bos taurus*), suínos (*Sus scrofa*), camundongos (*Mus musculus*) e equinos (*Equus ferus caballus*), além de algumas espécies de peixes e aves, destacando sua relevância evolutiva na fisiologia espermática (DUN 1 *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2021).

No espermatozoide, a HSP70 está predominantemente localizada na região do acrossoma, no segmento equatorial da cabeça e na bainha mitocondrial da peça intermediária, sugerindo um papel crucial na proteção estrutural da membrana acrossomal, na regulação da função mitocondrial e na manutenção da integridade proteica durante a capacitação e a reação acrossômica (AHN *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2013). Dessa forma, a HSP70 emerge como um alvo de interesse em estudos sobre biologia e biotecnologia reprodutiva, especialmente em protocolos de criopreservação espermática e no desenvolvimento de estratégias para atenuar os efeitos deletérios do estresse oxidativo sobre a fertilidade masculina (WANG *et al.*, 2013).

## 2.6. SONDAS FLUORESCENTES

A utilização de sondas fluorescentes associadas à microscopia de epifluorescência é uma técnica fundamental para avaliar de forma precisa e não invasiva a funcionalidade dos espermatozoides (GALLO *et al.*, 2021). Essas sondas permitem a visualização e quantificação de alterações celulares, metabólitos e organelas, oferecendo um método eficaz para avaliar a qualidade espermática e identificar potenciais problemas associados à fertilidade (GENG *et al.*, 2023; JORGE *et al.*, 2024).

No presente estudo, foram empregadas três sondas fluorescentes: CellROX® Green Reagent®, MitoTracker Red e FITC-PSA, cada uma com finalidade específica relacionadas ao estresse oxidativo, atividade mitocondrial e integridade de membrana acrossomal, respectivamente.

### 2.6.1. CellROX® Green Reagent®

O CellROX® Green é um reagente fluorescente amplamente utilizado para detectar espécies reativas de oxigênio (EROs) em células vivas. Ele é capaz de penetrar

na célula e, em presença de EROs, torna-se fluorescente, emitindo fluorescência verde, com uma emissão máxima em 520 nm. Esta sonda se liga preferencialmente ao DNA oxidado, o que a torna um excelente indicador de danos celulares causados por oxidação (BONE *et al.*, 2013).

Além disso, uma característica importante desta sonda é sua permeabilidade à membrana celular, permitindo sua utilização em uma ampla variedade de tipos celulares, incluindo espermatozoides. Essa versatilidade torna o CellROX® Green uma ferramenta útil para monitorar não apenas o estresse oxidativo em células somáticas, mas também em células reprodutivas, como os espermatozoides, que são particularmente sensíveis ao desequilíbrio entre EROs e antioxidantes. Em estudos de estresse oxidativo, esta sonda tem sido utilizada para avaliar o impacto do ambiente oxidativo sobre a saúde espermática, oferecendo dados cruciais para a análise da qualidade espermática e da sua capacidade fecundante (PALACIN-MARTINEZ *et al.*, 2024).

#### 2.6.2. MitoTracker Red

O MitoTracker Red é uma sonda fluorescente lipofílica que se acumula seletivamente na membrana mitocondrial interna, dependendo do potencial de membrana mitocondrial. Sua fluorescência vermelha intensa, com emissão máxima em 610 nm, permite a avaliação da atividade mitocondrial em células espermáticas. Quando excitada por luz em um comprimento de onda adequado, a MitoTracker Red emite fluorescência vermelha, permitindo a visualização e a análise da distribuição mitocondrial nas células. A intensidade da fluorescência está diretamente relacionada ao estado funcional das mitocôndrias: uma alta atividade mitocondrial resulta em uma maior incorporação da sonda e, conseqüentemente, uma fluorescência mais intensa, enquanto uma baixa atividade mitocondrial se traduz em uma fluorescência reduzida (BALDI *et al.*, 2022).

A atividade mitocondrial é um parâmetro crítico para a motilidade e funcionalidade espermática, pois a mitocôndria é responsável pela produção de ATP, essencial para o movimento flagelar. Assim, a avaliação da intensidade da fluorescência emitida pela MitoTracker Red é uma ferramenta eficaz para investigar a saúde e a função das mitocôndrias, e pode ser utilizada como indicador do potencial de fecundação dos espermatozoides (SARGIACOMO *et al.*, 2021).

### 2.6.3. FITC-PSA

A sonda fluorescente lectina de *Pisum sativum* aglutinina (FITC-PSA) é uma ferramenta específica para a avaliação da integridade da membrana acrossomal. O FITC-PSA se liga especificamente ao carboidrato terminal presente nas glicoproteínas da membrana acrossomal, proporcionando uma coloração verde intensa. Quando excitada por luz de comprimento de onda adequado, a fluorescência emitida pelo FITC-PSA permite a visualização clara da presença ou ausência de proteínas associadas ao acrossomo, uma estrutura localizada na região apical da cabeça do espermatozoide, contendo enzimas essenciais para a penetração no oócito durante a fecundação (GARCIA, 2005).

Em espermatozoides com o acrossomo íntegro, o FITC-PSA exibe uma fluorescência intensa, indicando que a membrana acrossomal ainda está intacta e funcional e não foi modificada por processos de reação acrossomal. Por outro lado, nos espermatozoides que passaram por reação acrossomal ou sofreram danos de membrana acrossomal, a fluorescência do FITC-PSA é diminuída ou ausente, uma vez que a estrutura da membrana é alterada e o carboidrato não está mais presente. Dessa forma, o FITC-PSA é uma ferramenta essencial para diferenciar espermatozoides com membrana acrossomal intacta daqueles que passaram por reação acrossomal, ajudando a monitorar a qualidade e a funcionalidade dos espermatozoides em processos de fecundação (CASTIGLIONI, 2021).

### 3. JUSTIFICATIVA

O estresse oxidativo representa um dos principais fatores que comprometem a qualidade espermática, prejudicando tanto a fecundação quanto o desenvolvimento embrionário. Dentre os mecanismos de defesa celular contra esses danos, as chaperonas moleculares, como a HSP70, desempenham um papel crucial, protegendo as células contra os efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio (EROs). As proteínas da família HSP70 possuem uma característica enzimática única, capaz de corrigir alterações conformacionais em outras proteínas, processo que demanda energia na forma de ATP. Além disso, essas proteínas facilitam a translocação de outras proteínas através das membranas celulares, desempenhando uma função essencial na preservação da integridade estrutural e funcional das células. Essas chaperonas respondem rapidamente ao estresse oxidativo, protegendo as enzimas e outras proteínas vitais da desestabilização induzida pelos EROs. Dado o seu papel fundamental, investigar o funcionamento do HSP70 nesse contexto é imprescindível para compreender os mecanismos moleculares de defesa celular, oferecendo uma compreensão mais profunda de como reduzir ou contornar os danos causados pelo estresse oxidativo. Este estudo visa não apenas expandir o conhecimento sobre a biologia reprodutiva, mas também identificar potenciais alvos terapêuticos que possam ser explorados no tratamento da infertilidade associada ao estresse oxidativo. Ao elucidar a função da HSP70 nos espermatozoides, espera-se contribuir significativamente para avanços na compreensão dos mecanismos de defesa espermática em resposta ao estresse oxidativo.

#### **4. HIPÓTESE**

A HSP70 desempenha um papel protetor crucial na manutenção da qualidade dos espermatozoides bovinos sob estresse oxidativo, minimizando os danos causados pelo aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) e assegurando a integridade mitocondrial e acrossomal.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. OBJETIVO GERAL

Estudar o papel da HSP70 na resposta dos espermatozoides bovinos ao estresse oxidativo, com foco em sua influência na manutenção da qualidade espermática sob condições adversas.

### 5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a participação da HSP70 na regulação do equilíbrio redox, avaliando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em espermatozoides sob estresse oxidativo.
- Avaliar o impacto da HSP70 na atividade mitocondrial de espermatozoides em condições de estresse oxidativo.
- Estudar o papel da HSP70 na manutenção da integridade da membrana acrossomal em espermatozoides bovinos expostos ao estresse oxidativo.

## 6. MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1. COLETA DE TESTÍCULOS BOVINOS

Foram coletados nove pares de testículos de bovinos adultos com epidídimos intactos no frigorífico Frigobendo, em Santa Terezinha de Itaipu, Paraná. Os órgãos foram transportados em uma caixa térmica para o laboratório, mantidos em temperatura adequada e processados dentro de um intervalo de duas horas para a coleta dos espermatozoides.

### 6.2. COLETA DE ESPERMATOZOIDES

Os epidídimos foram cuidadosamente removidos dos testículos, e a porção da cauda do epidídimo foi dissecada com o auxílio de um bisturi. Em seguida, os epidídimos dissecados foram lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS; 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> e 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) e transferidos para placas de Petri. O tecido epididimário foi então fragmentado com um bisturi, e o fluido contendo os espermatozoides foi coletado aplicando-se uma leve pressão sobre a região caudal dos epidídimos. O fluido epididimário foi transferido para tubos Eppendorf de 2 mL, mantidos em um bloco térmico durante a coleta para preservar a temperatura dos espermatozoides. Após a coleta, o fluido epididimário foi transferido para tubos Falcon de 15 mL contendo 10 mL de meio TALP (Tyrode Albumina Lactato Piruvato) e centrifugado a 1.500 rpm durante 5 minutos a 37 °C, garantindo a remoção do fluido epididimário.

### 6.3. INCUBAÇÃO DOS ESPERMATOZOIDES

Após a coleta e lavagem dos espermatozoides da cabeça do epidídimo, as células espermáticas foram ressuspensas em meio TALP-Stock e na concentração de 5 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL. Em seguida, os espermatozoides foram divididos em 4 grupos e incubados sob as seguintes condições experimentais: Grupo 1 - Controle (sem estresse oxidativo e sem inibidor de HSP70); Grupo 2 - Espermatozoides incubados com o inibidor de HSP70 (0,5 µM Ver-155008); Grupo 3 - Espermatozoides incubados sob estresse oxidativo (2 µM 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>); e Grupo 4 - Espermatozoides incubados sob estresse oxidativo (2 µM 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e com o inibidor de HSP70 (0,5 µM Ver -155008). As suspensões foram incubadas a 38,5 °C, em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> e alta umidade, por um período de 2 horas. Ao término da incubação os espermatozoides foram imediatamente

processados para avaliação.

#### 6.4. AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo foi avaliado utilizando a sonda fluorescente CellROX® Green Reagent® (Life Technologies, Nova York, EUA). Essa sonda se liga ao DNA oxidado por radicais livres intracelulares, emitindo uma fluorescência verde intensa. Para o experimento, 150 µL de sêmen diluído em TALP ( $5 \times 10^6$  espermatozoides/mL) foram incubados com 2 µL de CellROX (0,76 µM) e 2 µL de Hoechst 33342 (40 µg/mL) a 38,5 °C durante 20 minutos. Após a incubação, 10 µL da suspensão espermática foram colocados entre lâmina e lamínula, removendo-se o excesso com papel absorvente. Foram avaliadas 100 células sob um microscópio de epifluorescência com onda de excitação de 488 nm e emissão de 590 nm para detecção da fluorescência verde.

#### 6.5. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL

A avaliação da função mitocondrial dos espermatozoides foi realizada utilizando a sonda fluorescente MitoTracker Red (Life Technologies, Nova York, EUA). Para o experimento, foram adicionados 1,5 µL de MitoTracker (0,76 µM) e 2 µL de Hoechst 33342 (40 µg/mL) em 150 µL de sêmen diluído em meio TALP ( $5 \times 10^6$  espermatozoides/mL), e a suspensão foi incubada a 38,5 °C por 20 minutos. Após a incubação, 10 µL da suspensão espermática foram depositados entre lâmina e lamínula, removendo-se o excesso com papel absorvente. A análise foi realizada sob microscópio de fluorescência, com excitação a 355 nm e 520 nm, e emissão a 452 nm e 610 nm, correspondentes às fluorescências azul (Hoechst) e vermelha (MitoTracker). Foram avaliadas 100 células para determinar a integridade mitocondrial.

#### 6.6. AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DE MEMBRANA ACROSSOMAL

A avaliação da integridade de membrana acrossomal foi realizada utilizando a sonda fluorescente FITC-PSA (Life Technologies, Nova York, EUA). O FITC/PSA é utilizado para avaliar a integridade da membrana acrossomal, pois marca as glicoproteínas presentes nesta estrutura, em células permeabilizadas. Para o experimento, 20 µL de sêmen ( $5 \times 10^6$  espermatozoides/mL) fixado em paraformaldeído foi colocado na lâmina e deixado secar. Em seguida, 50 µL da solução de sondas (190 µL de PBS, 10 µL

de FITC-PSA 50 µg/mL e 3 µL de Hoechst) foram incubados com espermatozoides na lâmina por 10 minutos. Após a incubação, foi colocado a lamínula, removendo-se o excesso de solução com papel absorvente. Foram avaliadas 100 células sob um microscópio de epifluorescência com onda de excitação de 488 nm e emissão de 590 nm para detecção da fluorescência verde.

#### 6.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística dos dados, utilizou-se o software SigmaPlot 14.0 (Systat Software, Inc., Califórnia, EUA). Os dados foram inicialmente avaliados quanto à normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e à homogeneidade de variâncias (teste de Levene). Após avaliação dessas premissas, realizou-se uma ANOVA de dois fatores (two-way ANOVA), seguida por comparações múltiplas pelo teste de Tukey, adotando-se um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

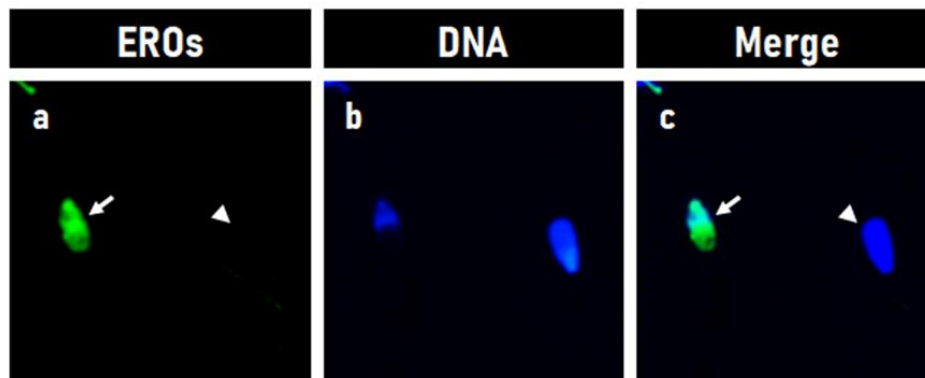
## 7. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 7.1. AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade antioxidante das células, podendo comprometer a estrutura e a função dos espermatozoides, impactando a qualidade do sêmen. Devido à defesa antioxidante enzimática limitada, essas células apresentam baixa capacidade de neutralizar as EROs, tornando-se mais suscetíveis à peroxidação lipídica e aos danos no DNA (PARECE, 2022).

O presente estudo investigou a participação da proteína de choque térmico 70 (HSP70) na proteção dos espermatozoides contra o estresse oxidativo, avaliando a porcentagem de células com alta fluorescência da sonda CellROX Green, indicativa de elevada produção de EROs. O padrão de fluorescência emitido pela sonda CellRox green em espermatozoides bovinos com alto e baixo nível de EROS está ilustrado na Figura 8.

**Figura 8** – Padrão de fluorescência emitida pela sonda CellRox Green em espermatozoides bovinos com alto ou baixo nível de estresse oxidativo



**Estresse oxidativo em espermatozoides bovinos.** A seta (a,c) indica um espermatozoide com estresse oxidativo, caracterizado por um alto nível de espécies reativas de oxigênio (CellRox Green +). A ponta de seta (a, c) indica um espermatozoide com baixos níveis de espécies reativas de oxigênio, sem indicativo de estresse oxidativo. A marcação de espécies reativas de oxigênio com CellRox Green está apresentada em (a), enquanto a marcação nuclear com Hoechst 33342 é exibida em (b). A sobreposição das imagens (a) e (b) é mostrada em (c). Fonte: Autora, 2025.

Os resultados apresentados no Gráfico 1 demonstram que a inibição da HSP70, por si só, não induziu aumento significativo ( $p > 0,05$ ) na porcentagem de espermatozoides com estresse oxidativo quando comparado ao grupo controle ( $16,7 \pm$

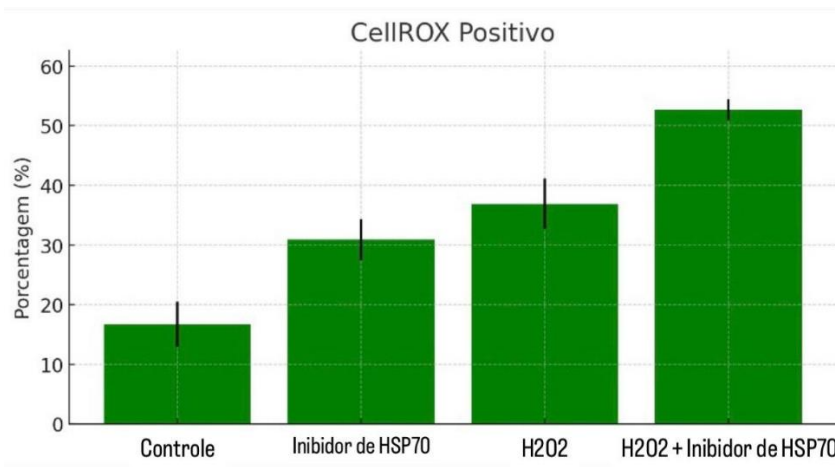
3,8% no Grupo 1 vs.  $30,9 \pm 3,4\%$  no Grupo 2). Esse achado sugere que, sob condições fisiológicas, a HSP70 pode não desempenhar um papel central no equilíbrio redox espermático. Estudos anteriores indicam que a HSP70 está envolvida em mecanismos de proteção celular contra o estresse térmico e apoptótico (KIANG & TSOKOS, 1998), mas seu papel na homeostase oxidativa basal dos espermatozoides ainda não está totalmente elucidado.

A indução do estresse oxidativo pelo  $H_2O_2$  (Grupo 3) resultou em um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na porcentagem de espermatozoides positivos para a sonda CellROX Green ( $36,9 \pm 4,2\%$ ), confirmando que o tratamento foi eficaz na indução de EROs. Esse resultado está de acordo com estudos prévios que demonstram que o  $H_2O_2$  é um dos principais agentes indutores de estresse oxidativo nos espermatozoides, contribuindo para a peroxidação lipídica, disfunção mitocondrial e danos ao DNA espermático (AITKEN *et al.*, 2014).

Curiosamente, a inibição da HSP70 (Grupo 2) resultou em um percentual de espermatozoides com estresse oxidativo semelhante ao observado no grupo tratado com  $H_2O_2$  (Grupo 3), sem diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) entre esses grupos. Esse achado sugere que a ausência funcional da HSP70 pode comprometer mecanismos celulares envolvidos na defesa antioxidante, tornando os espermatozoides mais vulneráveis ao estresse oxidativo mesmo sem a adição de um agente oxidante exógeno. Considerando que a HSP70 está envolvida na estabilização de proteínas e na prevenção da agregação proteica sob condições de estresse (DAUGAARD *et al.*, 2007), sua inibição pode levar à perda de mecanismos adaptativos que limitam a produção endógena de EROs.

O Grupo 4, que recebeu tratamento combinado com  $H_2O_2$  e inibidor da HSP70, apresentou a maior porcentagem de espermatozoides positivos para a sonda CellROX Green ( $52,7 \pm 1,7\%$ ), diferindo significativamente ( $p > 0,05$ ) de todos os outros grupos. Esse resultado indica que a ausência funcional da HSP70 em um ambiente de estresse oxidativo exacerba a produção de EROs nos espermatozoides, reforçando a hipótese de que essa chaperona exerce um papel protetor em condições de estresse. Esse achado é consistente com estudos que demonstram que a HSP70 contribui para a proteção antioxidante em células germinativas, possivelmente por meio da regulação de enzimas antioxidantes e da modulação da sinalização celular sob estresse oxidativo (GUO *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2022).

**Gráfico 1** – Efeito da inibição da HSP70 e do estresse oxidativo induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na produção de espécies reativas de oxigênio em espermatozoides bovinos



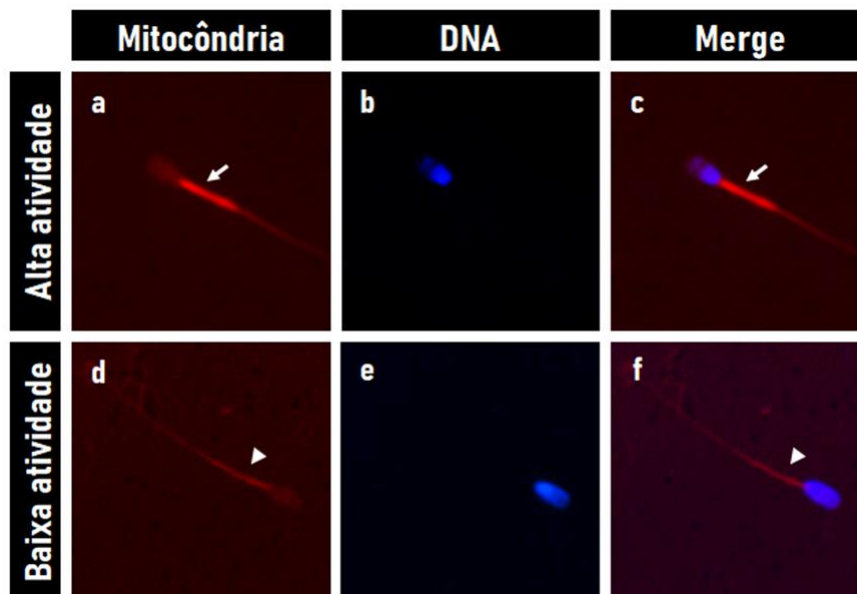
Fonte: Autora, 2025.

Em conjunto, esses resultados sugerem que, embora a HSP70 não pareça ser essencial para a manutenção do equilíbrio redox em espermatozoides sob condições fisiológicas, sua presença torna-se crítica em situações de estresse oxidativo exacerbado. A inibição dessa chaperona agrava o impacto do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aumentando significativamente a carga oxidativa celular. Assim, a HSP70 pode desempenhar um papel fundamental na preservação da integridade espermática frente a desafios ambientais que promovem estresse oxidativo.

## 7.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL

A atividade mitocondrial é um parâmetro essencial para a funcionalidade espermática, uma vez que as mitocôndrias são responsáveis pela produção de ATP, fundamental para a motilidade e outras funções celulares críticas, incluindo o movimento flagelar (SARGIACOMO *et al.*, 2021). No presente estudo, a atividade mitocondrial nos espermatozoides foi avaliada por meio da sonda MitoTracker, que emite fluorescência vermelha intensa na peça intermediária (localização das mitocôndrias) dos espermatozoides com alta atividade mitocondrial. A Figura 9 ilustra o padrão de fluorescência emitida pela sonda MitoTracker em espermatozoides com alta ou baixa atividade mitocondrial.

**Figura 9** – Padrão de fluorescência emitida pela sonda MitoTracker em espermatozoides bovinos com alta e baixa atividade mitocondrial



**Atividade mitocondrial em espermatozoides bovinos.** As figuras (a-c) representam um espermatozoide com alta atividade mitocondrial. As figuras (d-f) correspondem a um espermatozoide com baixa atividade mitocondrial. A seta (a, c) indica intensa marcação para a atividade mitocondrial na peça intermediária, enquanto a ponta de seta (d, f) indica uma marcação fraca na peça intermediária. Marcação mitocondrial com MitoTracker é mostrada em (a, d). Marcação nuclear com Hoechst 33342 em (b, e). A combinação de (a-b) e (d-e) é mostrada em (c) e (f), respectivamente. Fonte: Autora, 2025.

Os resultados apresentados no Gráfico 2 demonstram que a porcentagem de espermatozoides com alta atividade mitocondrial foi significativamente ( $p < 0,05$ ) maior no grupo controle ( $76,3 \pm 3,6\%$ ) e apresentou uma redução progressiva nos grupos tratados: Grupo 2 ( $61,6 \pm 3,7\%$ ), Grupo 3 ( $60,3 \pm 2,7\%$ ) e Grupo 4 ( $46,9 \pm 4,9\%$ ). Esses achados indicam que tanto a inibição da HSP70 quanto o estresse oxidativo promovido pelo  $H_2O_2$  comprometem a atividade mitocondrial espermática.

A redução significativa ( $p < 0,05$ ) na porcentagem de espermatozoides com alta atividade mitocondrial no grupo tratado com inibidor da HSP70 (Grupo 2) em comparação ao grupo controle sugere que essa chaperona desempenha um papel essencial na manutenção da funcionalidade mitocondrial. A HSP70 é uma chaperona essencial para a proteção proteica e a estabilidade mitocondrial, prevenindo a denaturação proteica sob condições de estresse celular (DAUGAARD *et al.*, 2007; DUNCAN *et al.*, 2015). Assim, a diminuição na atividade mitocondrial observada no Grupo 2 reforça o papel fisiológico dessa proteína na preservação da bioenergética espermática. Adicionalmente, em células germinativas, sua função pode ser ainda mais crítica, visto que a mitocôndria

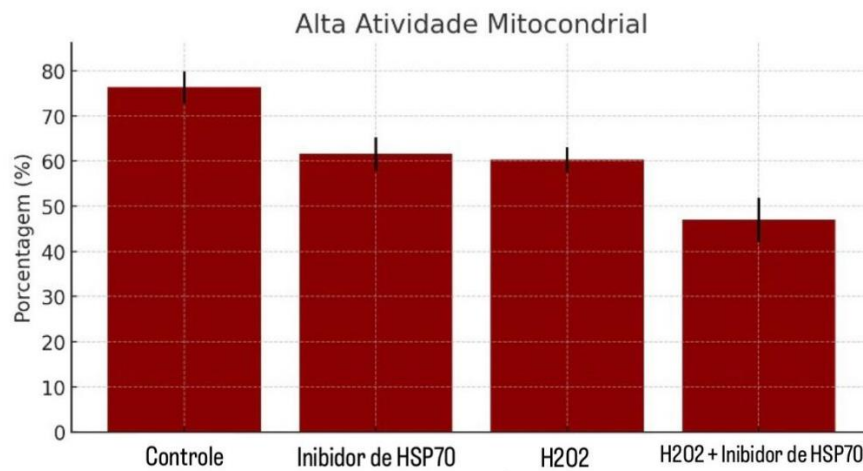
dos espermatozoides é responsável pela geração de ATP necessário para a motilidade e consequentemente para o sucesso da fecundação (AITKEN *et al.*, 2014).

O tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Grupo 3) também resultou em uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da porcentagem de espermatozoides com alta atividade mitocondrial, confirmando que o estresse oxidativo prejudica a funcionalidade mitocondrial. A exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> promove o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas mitocôndrias, levando à disfunção do potencial de membrana mitocondrial e consequente comprometimento da produção de ATP (AITKEN, 2017). Esse efeito pode estar associado a danos oxidativos em proteínas da cadeia transportadora de elétrons e na membrana mitocondrial, resultando em uma menor capacidade de geração de energia (TURRENS, 2003).

Interessantemente, a inibição da HSP70 (Grupo 2) levou a uma redução da atividade mitocondrial semelhante à observada no grupo tratado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Grupo 3), sem diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) entre eles. Esse achado sugere que a HSP70 exerce um papel protetor basal na função mitocondrial, sendo essencial para a homeostase redox dos espermatozoides. A ausência funcional dessa chaperona parece mimetizar os efeitos deletérios do estresse oxidativo, reforçando a hipótese de que a HSP70 contribui para a estabilidade das proteínas mitocondriais e para a preservação do metabolismo energético celular (NILLEGODA *et al.*, 2015).

O Grupo 4, submetido ao tratamento combinado com inibidor da HSP70 e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, apresentou a menor porcentagem de espermatozoides com alta atividade mitocondrial, diferindo significativamente ( $p < 0,05$ ) de todos os outros grupos. Esse resultado indica que a ausência da HSP70 potencializa os efeitos do estresse oxidativo na mitocôndria espermática, exacerbando o comprometimento da bioenergética espermática. Esse achado está em consonância com estudos que demonstram que a HSP70 não apenas previne o colapso do potencial de membrana mitocondrial, mas também regula a resposta ao estresse oxidativo, evitando a apoptose e a degeneração celular (FEDER & HOFMANN, 1999). Adicionalmente, a HSP70 desempenha um papel crítico na proteção das mitocôndrias contra a degradação proteica induzida por ROS, e sua inibição pode amplificar os efeitos deletérios do estresse oxidativo (RAMALHO-SANTOS *et al.*, 2009).

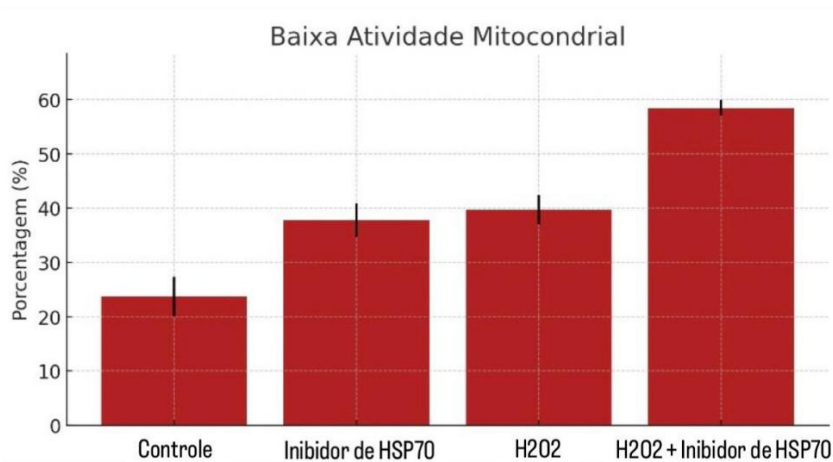
**Gráficos 2 – Influência da HSP70 e do estresse oxidativo na manutenção da atividade mitocondrial espermática**



Fonte: Autora, 2025.

Como esperado, a distribuição percentual de espermatozoides com baixa atividade mitocondrial seguiu um padrão oposto ao observado para os espermatozoides com alta atividade mitocondrial (Gráfico 3). Isso reforça que a HSP70 desempenha um papel essencial na proteção da mitocôndria em espermatozoides expostos ao estresse oxidativo, possivelmente modulando mecanismos antioxidantes e prevenindo a disfunção mitocondrial em condições adversas.

**Gráficos 3 – Efeito da inibição da HSP70 e do estresse oxidativo na disfunção mitocondrial espermática**



Fonte: Autora, 2025.

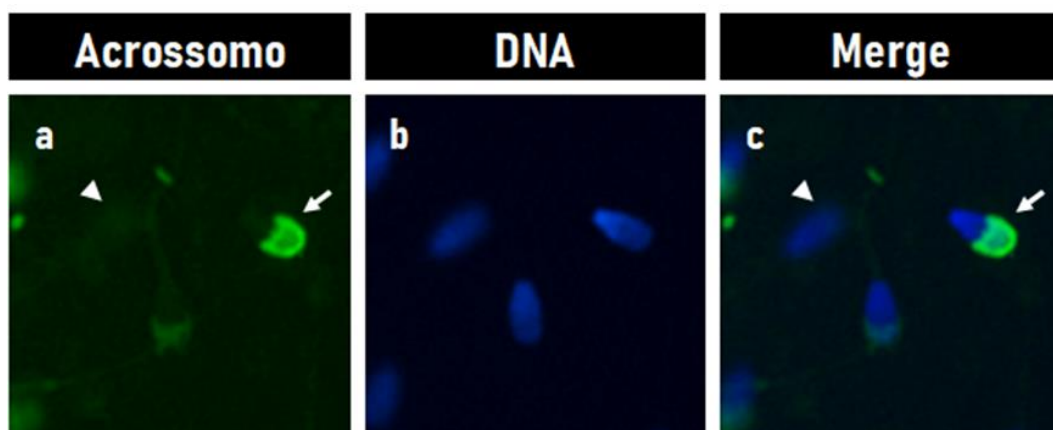
Em conjunto, esses resultados sugerem que a HSP70 é um fator crucial para a manutenção da homeostase mitocondrial nos espermatozoides. Sua inibição reduz

a atividade mitocondrial de forma semelhante à indução do estresse oxidativo por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e sua ausência em condições de estresse agrava ainda mais a perda da função mitocondrial. Esses achados são consistentes com estudos que demonstram que a redução na expressão de HSP70 está associada a danos mitocondriais e perda da viabilidade espermática sob condições adversas (JI *et al.*, 2012; WIDLAK & VYDRA, 2021).

### 7.3. AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DE MEMBRANA ACROSSOMAL

A integridade da membrana acrossomal é essencial para a função espermática, pois permite a liberação controlada de enzimas necessárias para a fecundação. A HSP70 tem sido associada à proteção celular contra danos induzidos por estresse oxidativo, desempenhando um papel crucial na homeostase proteica e na estabilização de membranas biológicas (DIX, 1997; DUN 2 *et al.*, 2012). No presente estudo, investigamos o impacto da inibição da HSP70 sobre a integridade da membrana acrossomal em espermatozoides bovinos expostos a estresse oxidativo. A avaliação da integridade acrossomal foi realizada por meio da sonda FITC-PSA (lectina de *Pisum sativum* aglutinina), cuja fluorescência verde intensa indica membrana acrossomal intacta. O padrão de fluorescência emitida pela sonda FITC-PSA em espermatozoides com a membrana acrossomal intacta ou reagida está ilustrada na Figura 10.

**Figura 10** – Padrão de marcação da sonda FITC-PSA em espermatozoides bovinos com membrana acrossomal íntegra ou reagida

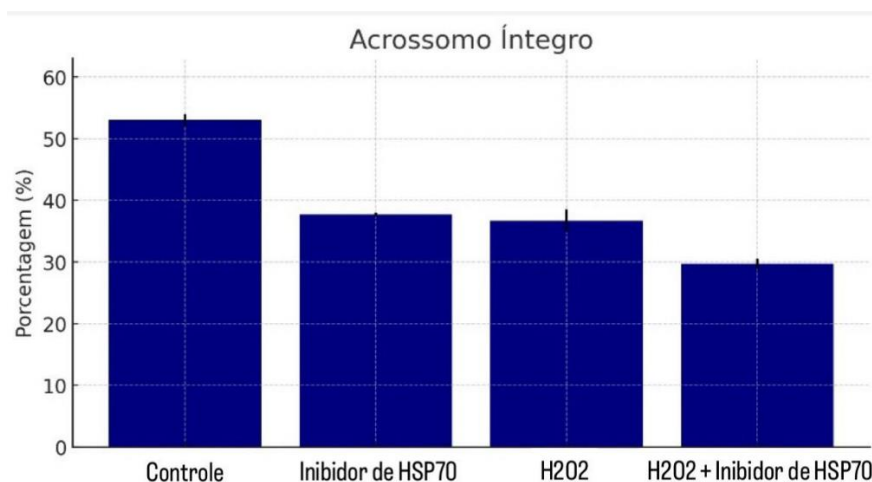


**Integridade da membrana acrossomal em espermatozoides bovinos.** A seta (a, c) indica um espermatozoide com membrana acrossomal intacta (forte marcação com FITC-PSA). A ponta de seta indica um espermatozoide com acrossoma reagido (sem marcação com FITC-PSA). A marcação da membrana acrossomal realizada com FITC-PSA é mostrada em (a). A marcação nuclear com Hoechst 33342 está representada em (b). A sobreposição de imagens (a-b) é mostrada em (c). Fonte: Autora, 2025.

Os resultados apresentados no Gráfico 4 revelaram que a porcentagem de espermatozoides com membrana acrossomal intacta foi significativamente maior no grupo controle ( $53,0 \pm 1,0\%^a$ ) em comparação aos grupos tratados ( $p < 0,05$ ). A inibição da HSP70 (Grupo 2) levou a uma redução significativa na integridade da membrana acrossomal ( $37,7 \pm 0,3\%^b$ ), evidenciando que a HSP70 desempenha um papel protetor contra danos estruturais de membrana. Esse resultado está em concordância com estudos anteriores que indicam a HSP70 como um fator crítico na preservação da integridade de membranas biológicas em diferentes sistemas celulares (AITKEN, 2020; MECCARIELLO *et al.*, 2014).

O grupo tratado com  $H_2O_2$  (Grupo 3) também apresentou uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) na integridade acrossomal ( $36,7 \pm 1,9\%^b$ ), reforçando que o estresse oxidativo prejudica a estabilidade da membrana. O  $H_2O_2$  é um potente indutor de estresse oxidativo que compromete a homeostase espermática, causando danos lipídicos e proteicos na membrana plasmática e acrossomal (AITKEN, 2022; RAMALHO-SANTOS *et al.*, 2009). O fato de o Grupo 2 não diferir do Grupo 3 sugere que a inibição da HSP70 mimetiza os efeitos do estresse oxidativo na membrana acrossomal, corroborando achados que apontam a HSP70 como um mecanismo de proteção celular contra lesões oxidativas (BALOGI *et al.*, 2019).

**Gráfico 4** – Papel da HSP70 na preservação da integridade acrossomal em espermatozoides expostos ao estresse oxidativo



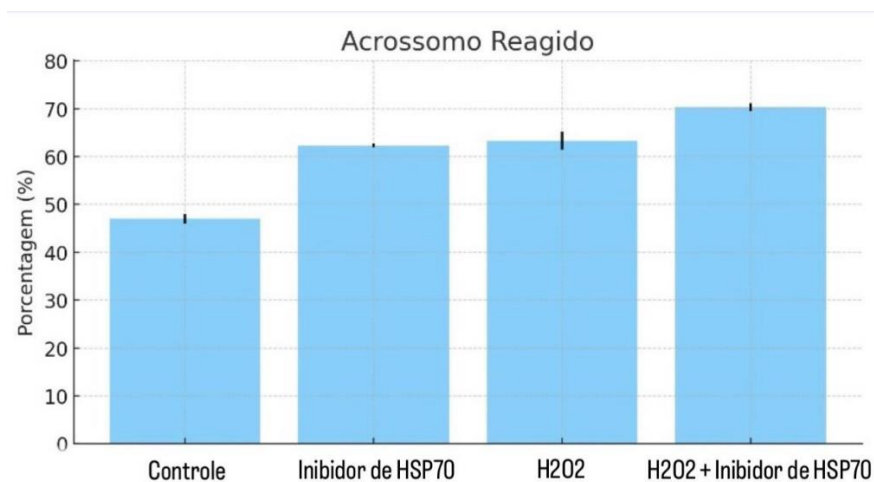
Fonte: Autora, 2025.

Notavelmente, o Grupo 4 ( $H_2O_2$  + inibidor de HSP70) apresentou a menor porcentagem de espermatozoides com membrana acrossomal intacta ( $29,7 \pm 0,9\%^c$ ), significativamente inferior a todos os demais grupos. Esse resultado sugere um efeito

sinérgico entre o estresse oxidativo e a inibição da HSP70, exacerbando a perda da integridade acrossomal. Corroborando com esses achados, estudos indicam que a HSP70 atua na estabilização de componentes da membrana e na prevenção da oxidação de lipídeos e proteínas essenciais à função espermática (AITKEN, 1990; O'FLAHERTY *et al.*, 2006).

Os dados referentes à porcentagem de espermatozoides com membrana acrossomal reagida (Gráfico 5) apresentaram um padrão inverso ao observado para a membrana acrossomal íntegra. O grupo controle (Grupo 1) exibiu a menor porcentagem de espermatozoides com membrana acrossomal reagida, enquanto os grupos tratados com inibidor de HSP70 (Grupo 2) ou H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Grupo 3) apresentaram um aumento significativo desse parâmetro, sem diferença estatística entre eles. Notavelmente, o grupo tratado simultaneamente com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e inibidor de HSP70 (Grupo 4) exibiu a maior taxa de espermatozoides com membrana acrossomal reagida, reforçando a hipótese de que a HSP70 desempenha um papel crítico na preservação da integridade da membrana acrossomal frente ao estresse oxidativo.

**Gráfico 5** – Reação acrossomal em espermatozoides bovinos tratado com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e com inibidor da HSP70



Fonte: Autora, 2025.

Os dados do presente estudo reforçam que a HSP70 desempenha um papel fundamental na manutenção da integridade da membrana acrossomal, especialmente em condições de estresse oxidativo. A sua inibição resulta em alterações da estabilidade da membrana acrossomal de maneira comparável ao dano induzido pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e a combinação de ambos os fatores resulta em um efeito sinérgico negativo sobre a

estrutura acrossomal acentuando ainda mais os danos estruturais. Esses achados são consistentes com estudos anteriores que demonstram que proteínas de choque térmico exercem um papel essencial na homeostase celular, protegendo contra danos oxidativos e promovendo a estabilidade funcional das membranas espermáticas (BROMFIELD *et al.*, 2015; NEUER *et al.*, 2000).

No contexto da fisiologia espermática, é conhecido que o ambiente do trato reprodutor feminino impõe um desafio oxidativo natural aos espermatozoides, impulsionando a ativação de mecanismos de proteção celular, como os mediados pela HSP70. Assim, a redução na atividade mitocondrial e na integridade acrossomal observada com a inibição da HSP70 destaca sua relevância na preservação da funcionalidade espermática, sugerindo que sua ação é fundamental para a homeostase celular durante o transporte no trato reprodutor feminino, a capacitação espermática e fecundação. Portanto, os resultados reforçam a importância da HSP70 como um fator protetor dos espermatozoides bovinos, especialmente em condições adversas que comprometem a viabilidade celular e podem impactar a fecundação.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho investigou a importância da HSP70 na proteção dos espermatozoides bovinos sob condições de estresse oxidativo, destacando seu papel crucial na manutenção da funcionalidade espermática e na preservação da viabilidade celular. Os resultados obtidos demonstraram que a HSP70 atua como uma chaperona essencial, atenuando os danos causados pelo estresse oxidativo e assegurando a integridade da função espermática.

Os dados demonstraram que a inibição da HSP70 resultou em aumentos significativos na produção de EROs, comprometendo a integridade mitocondrial e acrossomal. Esses achados reforçam a relevância da HSP70 como um fator protetor contra o estresse oxidativo, confirmando a hipótese de que sua presença é fundamental para a sobrevivência e a funcionalidade dos espermatozoides em ambientes adversos.

Compreender o mecanismo de ação da HSP70 no contexto da biologia reprodutiva não só contribui para o avanço do conhecimento em fisiologia reprodutiva, mas também pode oferecer novas perspectivas para o desenvolvimento de estratégias visando à melhoria da fertilidade bovina em situações de estresse. Este estudo abre caminho para futuras pesquisas que possam explorar a manipulação da HSP70 como uma abordagem terapêutica para contornar os efeitos adversos do estresse oxidativo na reprodução animal.

Por fim, enfatiza-se a importância de pesquisas adicionais para aprofundar o entendimento sobre as interações entre estresse oxidativo, HSP70 e qualidade espermática, além de investigar a potencial aplicação de intervenções baseadas na modulação da atividade da HSP70. A busca por inovações que favoreçam a saúde reprodutiva e a eficiência produtiva no setor agropecuário é fundamental, especialmente em um cenário onde a fecundidade e a produção animal sustentáveis são de crescente importância.

## REFERÊNCIAS

- AEENI, Mahsa et al. The molecular mechanism behind insulin protective effects on testicular tissue of hyperglycemic rats. **Life Sciences**, v. 277, p. 119394, 2021.
- AGARWAL, Ashok; MAKKER, Kartikeya; SHARMA, Rakesh. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. **American journal of reproductive immunology**, v. 59, n. 1, p. 2-11, 2008.
- AHN, J. H. et al. Expression and localization of heat shock protein 70 in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 86, n. 5, p. 1261-1270, 2016.
- AITKEN, R. J. Reactive oxygen species and human sperm function. **Mechanism of Fertilization: Plants to Humans**, p. 179-188, 1990.
- AITKEN, Robert J. et al. Oxidative stress and male reproductive health. **Asian journal of andrology**, v. 16, n. 1, p. 31-38, 2014.
- AITKEN, Robert J. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. **Molecular reproduction and development**, v. 84, n. 10, p. 1039-1052, 2017.
- AITKEN, R. John. Impact of oxidative stress on male and female germ cells: implications for fertility. **Reproduction**, v. 159, n. 4, p. R189-R201, 2020.
- AITKEN, Robert John. Oxidative stress and reproductive function. **Reproduction**, v. 164, n. 6, p. E5-E8, 2022.
- ALCÂNTARA, Letícia Moura; TONIOLLI, Ricardo. A ESPERMATOGÊNESE. **Revista Ciência Animal**, v. 33, n. 4 2023.
- ALMEIDA, Glessler Silva. Estudo funcional comparativo das co-chaperonas moleculares p23A e p23B da Hsp90 de *Leishmania braziliensis*. 2014.
- ARAUJO, Endrigo Adonis Braga et al. AÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO NOS ESPERMATOZOIDES. **Veterinária e Zootecnia**, v. 24, n. 1, p. 70-83, 2017.
- BALDI, E. et al. P-037 A fluorescent probe for Reactive Oxygen Species (ROS) detection identifies spermatozoa with a better reproductive performance. **Human Reproduction**, v. 37, n. Supplement\_1, p. deac107. 035, 2022.
- BALOGI, Zsolt et al. Hsp70 interactions with membrane lipids regulate cellular functions in health and disease. **Progress in Lipid Research**, v. 74, p. 18-30, 2019.
- BIRBO, Bereket et al. Role of HSP90 in Cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 19, p. 10317, 2021.

BONE, Bradley; SEREDICK, Barbara; OLSZOWY, Mike. Reactive oxygen probes-a broad range of colors with easier labeling and compatibility with fixation: novel CellROX® reagents from Molecular Probes®(P3295). **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 1\_Supplement, p. 211.5-211.5, 2013.

BROMFIELD, Elizabeth G. et al. The impact of oxidative stress on chaperone-mediated human sperm–egg interaction. **Human Reproduction**, v. 30, n. 11, p. 2597-2613, 2015.

CASTIGLIONI, Vivian Cardoso. **Efeito do potencial mitocondrial dos espermatozoides bovinos na produção in vitro de embriões**. 2021. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

CASTRO, Letícia Signori de. Efeito do estresse oxidativo no espermatozoide e relação com o desenvolvimento embrionário. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, 2014.

CELEGHINI, Eneiva Carla Carvalho et al. Relação entre a capacitação espermática e a fertilidade de sêmen criopreservado de bovinos. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 47, n. 2, p. 182-190, 2023.

CELIO, M.R., ADÉ-DAMILANO, M., BOURQUARD, E. Module 3 - Gametogenesis. In *Human Embryology*, 2025. <https://embryology.ch/en/embryogenese/gametogenesis/>

CSERMAK JUNIOR, Antonio Carlos. Uso de sondas fluorescentes e do ensaio de ligação do espermatozoide de cão (*Canis lupus familiaris*) à membrana perivitelina do ovo de galinha (*Gallus gallus*) como método para predição da capacidade fertilizante do sêmen. 2011.

CUNHA, Andrielle Thainar Mendes. Caracterização morfofisiológica de espermatozoides do epidídimo e estabelecimento de protocolo para seu uso na produção in vitro de embriões bovinos. 2019.

DA COSTA, Bruna Bitencourt; STREIT JR, Danilo Pedro. Estresse oxidativo e antioxidantes no de sêmen de peixes. **Ciência Animal**, v. 29, n. 2, p. 93-109, 2019.

DAUGAARD, Mads; ROHDE, Mikkel; JÄÄTTELÄ, Marja. The heat shock protein 70 family: Highly homologous proteins with overlapping and distinct functions. **FEBS letters**, v. 581, n. 19, p. 3702-3710, 2007.

DA SILVA, Emanuel Isaque Cordeiro. Gametogênese Animal: espermatogênese e ovogênese. **IPA**, 2020.

DELUAO, Joshua C. et al. Oxidative stress and reproductive function: reactive oxygen species in the mammalian pre-implantation embryo. **Reproduction**, v. 164, n. 6, p. F95-F108, 2022.

DE OLIVA, Samara Urban; RINALDO, Pâmela Alt; STUMPP, Taiza. Biologia epididimária: maturação espermática e expressão gênica. **O mundo da Saúde**, v. 33, n. 4, p. 419-425, 2009.

DIX, David J. HSP 70 expression and function during gametogenesis. **Cell stress & chaperones**, v. 2, n. 2, p. 73, 1997.

DUN 1, M. D. et al. The role of molecular chaperones in sperm capacitation. **Journal of Molecular Biology**, v. 415, n. 1, p. 102-117, 2012.

DUN 2, Matthew D.; AITKEN, R. John; NIXON, Brett. The role of molecular chaperones in spermatogenesis and the post-testicular maturation of mammalian spermatozoa. **Human reproduction update**, v. 18, n. 4, p. 420-435, 2012.

DUNCAN, Emma J. et al. The role of HSP70 and its co-chaperones in protein misfolding, aggregation and disease. **The Networking of Chaperones by Co-chaperones: Control of Cellular Protein Homeostasis**, p. 243-273, 2015.

FEDER, Martin E.; HOFMANN, Gretchen E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annual review of physiology**, v. 61, n. 1, p. 243-282, 1999.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, María Rosario; VALPUESTA, José María. Hsp70 chaperone: a master player in protein homeostasis. **F1000Research**, v. 7, 2018.

FERREIRA, Laís Dantas et al. MATURAÇÃO, CAPACITAÇÃO, REAÇÃO ACROSSÔMICA E MOVIMENTO ESPERMÁTICO. **Ciência Animal**, v. 33, n. 3, p. 82 a 97-82 a 97, 2023.

GADELLA, Bart M. Reproductive tract modifications of the boar sperm surface. **Molecular Reproduction and Development**, v. 84, n. 9, p. 822-831, 2017.

GALLO, Alessandra et al. Sperm motility, oxidative status, and mitochondrial activity: Exploring correlation in different species. **Antioxidants**, v. 10, n. 7, p. 1131, 2021.

GARCIA, Alexandre Rossetto. O uso de sondas fluorescentes na avaliação morfofuncional de espermatozoides bovinos. 2005.

GENG, Yujie et al. Recent progress in the development of fluorescent probes for imaging pathological oxidative stress. **Chemical Society Reviews**, v. 52, n. 11, p. 3873-3926, 2023.

GUALTIERI, Roberto et al. Sperm oxidative stress during in vitro manipulation and its effects on sperm function and embryo development. **Antioxidants**, v. 10, n. 7, p. 1025, 2021.

GUO, Shuhong et al. Heat shock protein 70 regulates cellular redox status by modulating glutathione-related enzyme activities. **Cell stress & chaperones**, v. 12, n. 3, p. 245, 2007.

Jl, Zi-Liang et al. Association of heat shock proteins, heat shock factors and male infertility. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 1, n. 1, p. 76-84, 2012.

JORGE, Manuela et al. Effect of Urolithin A on Bovine Sperm Capacitation and In Vitro Fertilization. **Animals**, v. 14, n. 18, p. 2726, 2024.

JOHNSTON, Zoe C. et al. High-throughput phenotypic screening of the human spermatozoon. **Reproduction**, v. 163, n. 1, p. R1-R9, 2022.

KIANG, Juliann G.; TSOKOS, George C. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. **Pharmacology & therapeutics**, v. 80, n. 2, p. 183-201, 1998.

KOWALCZYK, Alicja. The role of the natural antioxidant mechanism in sperm cells. **Reproductive sciences**, v. 29, n. 5, p. 1387-1394, 2022.

KURKOWSKA, Wiktoria et al. Oxidative stress is associated with reduced sperm motility in normal semen. **American journal of men's health**, v. 14, n. 5, p. 1557988320939731, 2020.

LI, H. et al. Heat shock protein expression in spermatozoa: Role in male fertility and cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 228, p. 106743, 2021.

LINS, Luciana Araujo et al. ESTRESSE OXIDATIVO NA GESTAÇÃO: QUAL A PERCEPÇÃO NA ESPÉCIE EQUINA? REVISÃO. **Science And Animal Health**, v. 5, n. 2, p. 178-193, 2017.

LU, Yonggang; AITKEN, Robert John; LIN, Minjie. Ultrastructural investigation and in vitro recapitulation of spermatid differentiation in a potential bio-indicator species—The marine invertebrate *Galeolaria geminea* (Polychaeta: Serpulidae). **Plos one**, v. 12, n. 8, p. e0183986, 2017.

MADAEVA, I. M. et al. Heat shock protein HSP70 in oxidative stress in apnea patients. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 169, p. 695-697, 2020.

MECCARIELLO, Rosaria et al. Molecular chaperones, cochaperones, and ubiquitination/deubiquitination system: involvement in the production of high quality spermatozoa. **BioMed Research International**, v. 2014, n. 1, p. 561426, 2014.

NEUER, A. et al. The role of heat shock proteins in reproduction. **Human reproduction update**, v. 6, n. 2, p. 149-159, 2000.

NILLEGODA, Nadinath B. et al. Crucial HSP70 co-chaperone complex unlocks metazoan protein disaggregation. **Nature**, v. 524, n. 7564, p. 247-251, 2015.

O'FLAHERTY, Cristián; DE LAMIRANDE, Eve; GAGNON, Claude. Reactive oxygen species modulate independent protein phosphorylation pathways during human sperm capacitation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, n. 6, p. 1045-1055, 2006.

PALACIN-MARTINEZ, Cristina et al. The characterization of CellROX™ probes could be a crucial factor in ram sperm quality assessment. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 11, p. 1342808, 2024.

PARECE, Margarida Soares. Infertilidade Masculina: Stress Oxidativo e o Uso de Antioxidantes. **U.PORTO**, 2022.

RAMALHO-SANTOS, Joao et al. Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. *Human reproduction update*, v. 15, n. 5, p. 553-572, 2009.

RADMANESH, Fereshteh; RAZI, Mazdak; SHALIZAR-JALALI, Ali. Curcumin nano-micelle induced testicular toxicity in healthy rats; evidence for oxidative stress and failed homeostatic response by heat shock proteins 70-2a and 90. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 142, p. 111945, 2021.

RITOSSA, Ferruccio. Discovery of the heat shock response. **Cell Stress Chaperones**, v. 1, n. 2, p. 97, 1996.

RIVERA-CONCHA, Rodrigo et al. Cytotoxic Oxidative Stress Effects of Neutrophil Extracellular Traps' Components on Cattle Spermatozoa. **Antioxidants**, v. 13, n. 6, p. 733, 2024.

SANTOS, João Campos et al. Effect of a Novel Hydroxybenzoic Acid Based Mitochondria Directed Antioxidant Molecule on Bovine Sperm Function and Embryo Production. **Animals**, v. 12, n. 7, p. 804, 2022.

SHAHAT, Abdallah M.; RIZZOTO, Guilherme; KASTELIC, J. P. Amelioration of heat stress-induced damage to testes and sperm quality. **Theriogenology**, v. 158, p. 84-96, 2020.

SARGIACOMO, Camillo et al. MitoTracker Deep Red (MTDR) is a metabolic inhibitor for targeting mitochondria and eradicating cancer stem cells (CSCs), with anti-tumor and anti-metastatic activity in vivo. **Frontiers in Oncology**, v. 11, p. 678343, 2021.

SOARES, Carlos Mattos Teixeira; NEVES, M. M. O papel da gota citoplasmática na funcionalidade de espermatozoides em mamíferos: uma revisão atualizada. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 44, n. 3, p. 83-88, 2020.

SOUZA, Ana Paula Binato de. Proteômica do epidídimo suíno: uso do modelo imunocastrado na identificação de marcadores moleculares para a qualidade seminal. 2020.

STAUB, Christophe; JOHNSON, L. Spermatogenesis in the bull. **animal**, v. 12, n. s1, p. s27-s35, 2018.

TONIOLLI, Ricardo. Espécies reativas ao oxigênio, antioxidantes e suas implicações na qualidade do sêmen conservado de mamíferos domésticos. **Revista Investigação**, v. 16, n. 8, 2017.

TRAJANO, Francisco Mateus Gonçalves. Avaliação dos efeitos da histamina na contração do ducto epididimário da cauda do epidídimo de rato. Dissertação de Mestrado, UFRN, 2022.

TURRENS, Julio F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **The Journal of physiology**, v. 552, n. 2, p. 335-344, 2003.

WANG, X. et al. Identification and functional analysis of heat shock proteins in boar spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 2, p. 352-360, 2013.

WIDLAK, Wieslawa; VYDRA, Natalia. The role of heat shock factors in mammalian spermatogenesis. **The role of heat shock proteins in reproductive system development and function**, p. 45-65, 2017.

WYCK, Sarah et al. Oxidative stress in sperm affects the epigenetic reprogramming in early embryonic development. **Epigenetics & chromatin**, v. 11, p. 1-17, 2018.

ZHANG, Hong et al. Hsp70 in redox homeostasis. **Cells**, v. 11, n. 5, p. 829, 2022.