SHIRLEY ANDREA FLOREZ RODRIGUEZ

Impacto da qualidade espermática sobre a fertilidade *in vivo* em bovinos:
contribuição dos marcadores mitocondriais e subpopulações espermáticas

São Paulo

2017

SHIRLEY ANDREA FLOREZ RODRIGUEZ

Impacto da qualidade espermática sobre a fertilidade *in vivo* em bovinos:
contribuição dos marcadores mitocondriais e subpopulações espermáticas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obter o título de Doutor em Ciências

Departamento:
Reprodução Animal

Área de concentração:
Reprodução Animal

Orientadora:
Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini

De acordo: _____

Orientadora

São Paulo

2017

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Ficha catalográfica (obrigatório)

Solicitar após a conclusão do trabalho via formulário eletrônico:

<http://www.fmvz.usp.br/component/chronoforms/?chronoform=BI>
[B Ficha Catalografica](#)

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Contribuição da Mitocôndria Espermática na Predição do Potencial de Fertilidade In Vivo em Bovinos", protocolada sob o CEUA nº 3649100616, sob a responsabilidade de **Eneiva Carla Carvalho Celeghini e equipe; Shirley Andrea Florez Rodriguez; Felipe Barbosa Santos** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 15/08/2016.

We certify that the proposal "Contribution of the mitochondria sperm in the prediction of Potential Fertility In Vivo in Cattle", utilizing 25 Bovines (25 males), protocol number CEUA 3649100616, under the responsibility of **Eneiva Carla Carvalho Celeghini and team; Shirley Andrea Florez Rodriguez; Felipe Barbosa Santos** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 08/15/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **07/2016** a **12/2016**

Área: **Reprodução Animal**

Origem: **Amostras biológicas estocadas**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Machos**

idade: **0 a 0 meses**

N: **25**

Linhagem: **Nelore**

Peso: **0 a 0 kg**

Resumo: No tocante a qualidade espermática se requer especial atenção ao uso de testes laboratoriais para prever a fertilidade dos touros e das partidas de sêmen. Neste estudo serão avaliadas partidas de sêmen bovino comercial utilizadas para IATF de 4.523 fêmeas do projeto de pesquisa previamente aprovado por esta CEUA sob o número 4682260814 registrado em 26/08/2014, baseados no diagnóstico de fertilidade das mesmas. Vinte e cinco partidas de sêmen congelado, que foram catalogadas como aptas pelas análises convencionais e serão submetidas às análises mais avançadas pela citometria de fluxo. Serão realizadas as seguintes análises: (1) Avaliação das membranas plasmática, acrossomal, (2) Avaliação do potencial mitocondrial, (3) Produção de ânion superóxido pela mitocôndria espermática, (4) Produção de ânion superóxido citoplasmático, (5) Avaliação da peroxidação lipídica (6) Detecção de peroxinitrito (ONOO), (7) Detecção do Óxido Nítrico (NO). (8) Avaliação do metabolismo espermático. A leitura será feita utilizando o citômetro BD Accuri C6 (Flow cytometer, BD Pharmingen). As partidas de sêmen submetidas a IATF, cujos valores de fertilidade serão comparados aos achados da avaliação laboratorial. Os dados de porcentagem de prenhez serão separados em duas classes, sendo considerados de alta fertilidade os valores $\geq 53\%$ e de média fertilidade os valores de $\geq 52\%$. Para avaliar o comportamento das análises convencionais e da citometria frente às classes de fertilidades observadas será utilizada a metodologia de Modelos Lineares Generalizados, pressupondo distribuição Binomial com função de ligação logística. Todas as análises serão realizadas pelo procedimento PROC GENMOD do programa estatístico computacional Statistical Analysis System, versão 9.2 (SAS, 2005).

Local do experimento: Este experimento será realizado no Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos (LATES) do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e no laboratório de morfofisiologia molecular e desenvolvimento (LMMD), da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) da Universidade de São Paulo, ambos localizados no Campus Administrativo de Pirassununga.

São Paulo, 16 de agosto de 2016

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: FLOREZ-RODRIGUEZ, Shirley Andrea

Título: **Impacto da qualidade espermática sobre a fertilidade *in vivo* em bovinos:**
contribuição de marcadores mitocondriais e subpopulações espermáticas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem-sucedidos.

Provérbios 16:3

Esta tese é dedicada aos meus anjos da guarda na terra:

Minha mãe, meu amor, pelo amor incondicional, pelas sábias palavras em todos os momentos da minha vida e pelo seu fervor nas orações para que o senhor Deus me encha de bênçãos.

Minha irmã Sandra, minha adoração, meu melhor presente da vida, o amor mais leal.

Meu pai, sempre presente, pelo apoio e suporte incondicional, pela dedicação e o esforço a suas filhas.

Minha família, minha fonte de fortaleza e palavras de alento.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por colocar pessoas tão maravilhosas no meu caminho.

À minha *família*, meus pais *Myriam e Alejandro*, e minha irmã *Sandra*.

À minha orientadora Profa. Dra. *Eneiva Carla Carvalho Celeghini* pela paciência, dedicação, pelo apoio em todo momento e pelo interesse por meu crescimento profissional. Mas, principalmente porque ao longo desses anos você não só me ensinou à ser uma pesquisadora, mas também um ser humano melhor, além que, você é meu melhor exemplo de trabalho, com coragem e determinação. Muito carinho e muita gratidão.

Ao Prof. Dr. *Rubens Paes de Arruda* pelas valiosas palavras e ensinamentos que levo comigo para a vida, obrigada pela ajuda incondicional, pelo incentivo, pela amizade e sobre tudo pelas críticas construtivas para me tornar uma melhor profissional. Quero que saiba que entraram por meus ouvidos e ficaram para sempre!!

Ao Prof. Dr. *Júlio Cesar Balieiro* pela ajuda que foi fundamental para este projeto.

Aos pós-graduandos e amigos: *Milena, Maíra, Leonardo, Nataly, Flávia, Vinícius, Vitinho, Fábio, Bruna, Débora, Danilo, Renata, Patrícia, Gabriel, Gabriela, Ticiano, Gisele, Angela, Alejandro, Moana, Mari, Thiago, Arroz, Agustin, Guilherme, Bia Cardoso, Eveton, Júlio*, pelo convívio do dia a dia e por fazer um ambiente de trabalho agradável.

Em destaque aos meus colegas *Sâmara, Felipe, Mariana e João Diego*, pelos aportes científicos e participação em diferentes pontos críticos do desenvolvimento deste experimento.

A *Manoel Francisco de Sá filho* pelo ajuda e concessão de partidas de sêmen bovino usadas no experimento.

Aos amigos colombianos: *Luis, Laura, Elizabeth, Andreita, Carito, Julian, Juli, Cristian, Haiber, German, Marcela e Laura Maria* pelos momentos especiais e inesquecíveis.

Aos amigos brasileiros *Camila, Priscila, Ana Carolina* vocês têm um lugar especial em meu coração.

Aos funcionários *Márcio, João, José Maria e Alexandra*.

À secretária *Harumi Shiraishi*, pela ajuda burocrática e presteza.

Ao secretário, *Clayton D. Costa*, pela presteza de sempre.

Ao Centro de *Biotechnologia e Reprodução Animal*, minha segunda casa.

Ao *CNPq* pela bolsa de doutorado.

E, por fim, a todos aqueles que não mencionei, mas que colaboraram para esta pesquisa e ao longo do doutorado. ***Muito obrigada!!!***

*"Somos o que repetidamente fazemos.
A excelência, não é um feito, mas um hábito.
Aristóteles*

RESUMO

FLOREZ-RODRIGUEZ, S.A. **Impacto da qualidade espermática sobre a fertilidade *in vivo* em bovinos**: contribuição de marcadores mitocondriais e subpopulações espermáticas [**Impact of sperm quality on the *in vivo* fertility in bovine**: contribution of mitochondrial markers and sperm subpopulations]. 2017. 175 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

O objetivo deste trabalho foi avaliar mediante testes *in vitro* as características espermáticas de partidas de sêmen bovino e o impacto sobre a fertilidade quando utilizadas em um programas de IATF. Foram realizados 4 experimentos que serão descritos em forma de artigos científicos. No **artigo 1** comparam-se a qualidade do sêmen determinada por métodos subjetivos e objetivos para a análise espermática *in vitro* de partidas de sêmen bovino. Foram analisadas 80 partidas de sêmen de dois touros, através de análises convencionais (motilidade subjetiva, vigor e morfologia espermática), de acordo com os resultados foram estabelecidos 3 grupos: Alta qualidade (A), Boa qualidade (B) e Qualidade questionável (Q). Posteriormente foram analisados os resultados das análises objetivas usando sondas fluorescentes por microscopia de epifluorescência para determinar a integridade de membranas plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial (%PIAIA); e usando o sistema computadorizado de avaliação da motilidade espermática (CASA), o efeito foi avaliado mediante ANOVA e Tukey 5%. Posteriormente, foram utilizadas 67 partidas para determinar a concordância em determinar a qualidade seminal de acordo com três métodos de avaliação seminal: (1) Análise subjetiva considerando a Motilidade subjetiva, vigor e morfologia espermática (2) Análise pelo CASA levando em consideração a MT, VCL, VSL e VAP e (3) Análise por sondas fluorescentes considerando a %PIAIA. Foram realizadas análises de correlação de Pearson e análise de concordância (significância do Kappa). No **artigo 2** foram utilizadas 18 partidas de sêmen classificadas de acordo com o índice de fertilidade de cada touro em dois grupos: de Alta (n=9) e Baixa fertilidade (n=9). A classificação do score foi proporcionada pela central com base em dados provenientes de 33.198 serviços por IATF. As partidas foram submetidas às análises convencionais, CASA, análise por sondas fluorescentes para avaliar a porcentagem de PIAIA em microscopia de epifluorescência e produção de marcadores mitocondriais por sondas fluorescentes na citometria de fluxo. Foram realizadas análises de correlação de Pearson todas as características espermáticas e os efeitos entre grupos de fertilidade foram avaliados mediante

ANOVA e Tukey 5%. No **artigo 3** o objetivo determinar a relação entre qualidade espermática medida pela produção de marcadores mitocondriais e integridade das estruturas espermáticas com a taxa de prenhez (TP%) resultante de um programa de inseminação artificial e tempo fixo (IATF). Neste estudo, 29 partidas de sêmen convencional usadas para inseminar 4.795 vacas da raça Nelore submetidas ao mesmo protocolo de IATF, e após o diagnóstico de prenhez foram classificadas em três grupos: Alta fertilidade (A) com TP $\geq 60\%$, Média fertilidade (M) TP entre 53,0 e 59,9% e de Baixa fertilidade (B) TP $< 52,2\%$. Doses de sêmen das mesmas partidas foram descongeladas a 37°C durante 30 segundos e submetidas às análises convencionais, CASA, análise por sondas fluorescentes para avaliar a porcentagem de PIAIA em microscopia de epifluorescência e produção de marcadores mitocondriais por sondas fluorescentes na citometria de fluxo. Foram realizadas análises de correlação de Spearman para todas as características espermáticas e os efeitos entre grupos de fertilidade foram avaliados mediante ANOVA e Tukey 5%. No **artigo 4** o objetivo foi determinar as subpopulações pela morfometria espermática em partidas de sêmen com diferente escore de fertilidade. Foram utilizadas 13 partidas de sêmen de 6 touros, sendo três touros de alto escore de fertilidade (n=9) e três de baixo escore de fertilidade (n=9). Duas palhetas de cada partida foram descongeladas e uma alíquota foi depositada em formol salino (4%) e posteriormente foi feito a análise por gota húmida para aquisição de 200 imagens da cabeça espermática que foram processadas pelo programa Imagem J para determinação da morfometria, os dados foram submetidos a análise multivariada de agrupamento para formação de subpopulações pelo método de Ward's e posteriormente o efeito do grupo de fertilidade foi avaliado por ANOVA e Tukey 5%. Os resultados mostraram que os marcadores da função mitocondrial são bons indicadores da função e qualidade espermática; no entanto a heterogeneidade do sêmen bovino, com subpopulações espermáticas com boa e má qualidade, varia entre touros e entre partidas do mesmo touro e gera confusão na resposta de algumas análises. Determinou-se também, que a presença de subpopulações espermáticas (SBP) com variação na morfometria da cabeça (SBP1, SBP2, SBP3 e SBP4), sendo que a SBP4 foi associada com baixo escore de fertilidade. A conclusão geral é que a qualidade seminal impacta na fertilidade *in vivo* em bovinos. Sendo que a morfometria da cabeça espermática e funcionalidade das mitocôndrias teve maior impacto. No entanto, todas as características de qualidade espermática devem ser avaliadas em conjunto para determinar o potencial de fertilidade de uma amostra seminal.

Palavras-chaves: Espermatozoide, Taxa de prenhez, Citometria de fluxo, Subpopulações

ABSTRACT

FLOREZ-RODRIGUEZ, S.A. **Impact of sperm quality on the *in vivo* fertility in bovine: contribution of mitochondrial markers and sperm subpopulations. [Impacto da qualidade espermática sobre a fertilidade *in vivo* em bovinos: contribuição de marcadores mitocondriais e subpopulações espermáticas]**. 2017. 175 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

The objective of this study was to evaluate the sperm characteristics of bovine semen and the impact on fertility when used in an IATF program. Four experiments were carried out and described in the form of scientific articles. In **article 1**. We compared the semen quality determined by subjective and objective methods for the *in vitro* sperm analysis of bovine semen. According to the results, three groups were analyzed: high quality (A), good quality (B) and high quality (A), Questionable quality (Q). Subsequently, the results of objective analyzes using fluorescence probes by epifluorescence microscopy were analyzed to determine the integrity of plasma, acrosomal membrane and mitochondrial membrane potential (% PIAIA); And using the computerized sperm motility evaluation system (CASA), the effect was evaluated using ANOVA and Tukey 5%. Afterwards, 67 matches were used to determine the agreement to determine seminal quality according to three methods of seminal evaluation: (1) Subjective analysis considering subjective motility, vigor and sperm morphology (2) Analysis by CASA taking into consideration the TM, VCL, VSL and VAP and (3) Analysis by fluorescent probes considering % PIAIA. Pearson correlation analysis and concordance analysis (Kappa significance) were performed. In **article 2**, 18 sets of semen were classified according to the fertility index of each bull in two groups: High fertility (n = 9) and Low fertility (n = 9). The classification of the score was provided by the central office based on data from 33,198 services by IATF. The semen were subjected to conventional analyzes, CASA, fluorescent probe analysis to evaluate the percentage of PIAIA in epifluorescence microscopy and production of mitochondrial markers by fluorescent probes in flow cytometry. Pearson correlation analyzes were performed on all sperm characteristics and effects between fertility groups were evaluated using ANOVA and Tukey 5%. In **article 3** the objective was to determine the relationship between sperm quality measured by the production of mitochondrial markers and the integrity of the spermatid structures with the pregnancy rate (TP%) resulting from an artificial insemination and fixed

time (IATF) program. In this study, 29 departures of conventional semen used to inseminate 4,795 Nelore cows submitted to the same IATF protocol, and after diagnosis of pregnancy were classified into three groups: High fertility (A) with TP $\geq$ 60%, Average fertility (M) TP between 53.0 and 59.9% and Low fertility (B) TP $<$ 52.2%. Semen doses of the same departures were thawed at 37 ° C for 30 seconds and subjected to conventional, CASA, fluorescent probe analysis to evaluate the percentage of PIAIA in epifluorescence microscopy and production of mitochondrial markers by fluorescent probes in flow cytometry. Spearman correlation analyzes were performed on all sperm characteristics and effects between fertility groups were evaluated using ANOVA and Tukey 5%. In article 3, 18 sets of semen were classified according to the fertility index of each bull in two groups: High (n = 9) and Low fertility (n = 9). The classification of the score was provided by the central office based on data from 33,198 services by IATF. The matches were subjected to conventional analyzes, CASA, fluorescent probe analysis to evaluate the percentage of PIAIA in epifluorescence microscopy and production of mitochondrial markers by fluorescent probes in flow cytometry. Pearson correlation analyzes were performed on all sperm characteristics and effects between fertility groups were evaluated using ANOVA and Tukey 5%. In **article 4** the objective was to determine subpopulations by sperm morphometry in semen matches with different fertility scores. Seventeen sets of six bulls were used, three bulls with a high fertility score (n = 9) and three with a low fertility score (n = 9). Two straws of each set were thawed and an aliquot was deposited in saline formaldehyde (4%) and then the wet analysis was performed to acquire 200 images of the spermatid head that were processed by the Image J program to determine morphometry, the data were submitted to a multivariate cluster analysis for clusters by the Ward's method and later the effect of the fertility group was evaluated by ANOVA and Tukey 5%. The results showed that markers of mitochondrial function are good indicators of sperm function and quality; However, the heterogeneity of bovine semen, with good and poor quality sperm subpopulations, varies between bulls and between straws and creates confusion in the response of some analyzes. It was also determined that the presence of sperm subpopulations (SBP) with variation in head morphometry (SBP1, SBP2, SBP3 and SBP4), and SBP4 was associated with a low fertility score. The overall conclusion is that seminal quality influences *in vivo* fertility in cattle. Being that the morphometry of the spermatid head and functionality of the mitochondria had greater impact. However, all sperm quality characteristics should be evaluated together to determine the fertility potential of a seminal sample.

Key-words: Sperm, Pregnancy rate, Flow cytometry, Subpopulations

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Médias ($\pm$ Erro padrão) das características espermáticas avaliadas de forma convencional de acordo com as três categorias: qualidade questionável (Q), boa qualidade (B) e alta qualidade (A)	66
Tabela 2 – Médias ($\pm$ Erro padrão) das características espermáticas avaliadas pelo CASA nas três categorias de qualidade seminal determinadas pelo análise convencional: questionável (Q), boa qualidade (B) e alta qualidade (A).....	67
Tabela 3 – Médias ($\pm$ Erro padrão) da avaliação por sondas fluorescentes das três categorias de qualidade seminal determinadas pelo análise convencional: alta qualidade: questionável (Q), boa qualidade (B) e alta qualidade (A).....	67
Tabela 4 – Correlações de Pearson entre as características espermáticas obtidas pela análise convencional e pela análise por CASA e sondas fluorescentes	68
Tabela 5 – Correlações de Pearson entre as características espermáticas obtidas pela análise convencional e pela análise computadorizada da motilidade	69
Tabela 6 – Correlação de Pearson entre as características espermáticas obtidas pela análise por sondas fluorescentes e pela análise computadorizada da motilidade.....	69
Tabela 7 – Distribuição das partidas de sêmen bovino nas classes convencional, PIAIA e CASA de acordo com as categorias Alta qualidade (A), Boa qualidade (B) e Questionável (Q).....	71
Tabela 8 – Resultados do Kappa geral para a concordância entre as três classes convencional, PIAIA e CASA	72
Tabela 9 – Resultados dos Kappa para a concordância entre as três classes convencional, PIAIA e CASA, de acordo com as categorias Alta qualidade (A), Boa qualidade (B) e Questionável (Q).....	72
Tabela 10 – Resultados do Kappa geral para a concordância entre as classe convencional e classe PIAIA Resultados do Kappa geral para a concordância entre as classe convencional e classe PIAIA	72
Tabela 11 – Resultados dos Kappa para a concordância entre as classes convencional e PIAIA de acordo com as categorias Alta qualidade (A), Boa qualidade (B) e Questionável (Q).....	73
Tabela 12 – Resultado do Kappa geral para a concordância entre as classes convencional e CASA	73
Tabela 13 – Resultado do Kappa para a concordância entre as classes convencional e CASA de acordo com as categorias Alta qualidade (A), Boa qualidade (B) e Questionável (Q).....	73
Tabela 14 – Resultados do Kappa geral para a concordância entre as classes PIAIA e CASA	74
Tabela 15 – Resultados dos Kappa para a concordância entre as classes PIAIA e CASA de acordo com as categorias Alta qualidade (A), Boa qualidade (B) e Questionável (Q)	74
Tabela 16 – Média ($\pm$ Erro padrão) das características espermáticas avaliadas por técnicas convencionais nos grupos de alta fertilidade e baixa fertilidade	93
Tabela 17 – Média ($\pm$ Erro padrão) das características da motilidade espermáticas avaliadas pelo sistema CASA, nos grupos de alta fertilidade e baixa fertilidade.....	94
Tabela 18 – Média ($\pm$ Erro padrão) das características espermáticas avaliadas pelo uso de sondas fluorescentes, para leitura com microscopia de epifluorescência: nos grupos de alta fertilidade e baixa fertilidade	94
Tabela 19 – Média ($\pm$ Erro padrão) das características espermáticas avaliadas por citometria de fluxo pelo uso de sondas fluorescentes, nos grupos de alta fertilidade de fertilidade e baixa fertilidade.....	95
Tabela 20 – Média ($\pm$ Erro padrão) das características espermáticas avaliadas por técnicas convencionais e seu efeito sobre o escore de fertilidade, nos grupos estabelecidos pela separação de quartis: Inferior, Médio e Superior.....	96

Tabela 21 – Média ($\pm$ Erro padrão) das características da motilidade espermática avaliadas pelo sistema computadorizado da motilidade (CASA): e seu efeito no escore de Fertilidade, nos grupos estabelecidos pela separação de quartis: Inferior, Médio e Superior	97
Tabela 22 – Média ($\pm$ Erro padrão) das características espermáticas avaliadas pelo uso de sondas fluorescentes, para leitura com microscopia de epifluorescência e seu efeito no escore de fertilidade, nos grupos estabelecidos pela separação de quartis: Inferior, Médio e Superior	98
Tabela 23 – Média ($\pm$ Erro padrão) das características espermáticas avaliadas com o uso de sondas fluorescentes pela citometria de fluxo. Nos grupos: Alta (A), Média (M) e Baixa fertilidade (B).....	98
Tabela 24 – Coeficientes de correlação de Pearson entre a taxa de prenhez dos grupos de alta e baixa fertilidade e as análises convencionais e análises objetivas (CASA e sondas fluorescentes).....	99
Tabela 25 – Relação das partidas classificadas nos três grupos de fertilidade: Alta (A), Média (M) e Baixa (B), segundo o resultado da taxa de prenhez (TP, %) na IATF por partida e a média $\pm$ erro padrão (EP).....	122
Tabela 26 – Média ($\pm$ Erro padrão) das características espermáticas avaliadas por técnicas convencionais nos grupos de fertilidade: Alta (A), Média (M) e Baixa (B).....	123
Tabela 27 – Média ($\pm$ Erro padrão) das características espermáticas avaliadas pelo sistema computadorizado da motilidade espermática (CASA), nos grupos de fertilidade: Alta (A), Média (M) e Baixa (B).....	123
Tabela 28 – Média ($\pm$ Erro padrão) das características espermáticas avaliadas pelo uso de sondas fluorescentes, para leitura com microscopia de epifluorescência: nos grupos: Alta (A), Média (M) e Baixa fertilidade (B)	124
Tabela 29 – Média ($\pm$ Erro padrão) das características espermáticas avaliadas por citometria de fluxo pelo uso de sondas fluorescentes, nos grupos de fertilidade: Alta (A), Média (M) e Baixa (B).....	124
Tabela 30 – Variabilidade total (CV total, %) e por grupo (CV fertilidade, %): Alta fertilidade (A), Média fertilidade (M) e Baixa fertilidade (B) e coeficientes de correlação de Spearman com taxa de prenhez (TP)	126
Tabela 31 – Média ($\pm$ Erro padrão) das características espermáticas avaliadas por técnicas convencionais e seu efeito na taxa de prenhez (%), nos grupos estabelecidos pela separação de quartis: Inferior, Médio e Superior.....	127
Tabela 32 – Média ($\pm$ Erro padrão) das características da motilidade espermática avaliadas pelo sistema computadorizado da motilidade (CASA): e seu efeito na taxa de prenhez (%) nos grupos estabelecidos pela separação de quartis: Quartil Inferior, Médio e Superior.....	128
Tabela 33 – Média ($\pm$ Erro padrão) das características espermáticas avaliadas pelo uso de sondas fluorescentes sob microscopia de epifluorescência: e seu efeito na taxa de prenhez (%) nos grupos estabelecidos pela separação de quartis: Quartil Inferior, Médio e Superior	128
Tabela 34 – Média ($\pm$ Erro padrão) das características espermáticas avaliadas por citometria de fluxo pelo uso de sondas fluorescentes e seu efeito na taxa de prenhez (%) nos grupos estabelecidos pela separação de quartis: Inferior, Médio e Superior	129
Tabela 35 – Coeficientes de correlação de Spearman entre a porcentagem de células com integridade de membrana plasmática e acrossoma íntegro (MAI) avaliada pela citometria de fluxo e as demais características espermáticas avaliadas tanto pelo convencional, sondas fluorescentes e citometria de fluxo, sendo colocados unicamente as características que tiveram significância estatística	130
Tabela 36 – Coeficientes de correlação de Spearman entre a porcentagem de células com integridade de membrana e espécies reativas de oxigênio mitocondriais (MITO-MI) avaliadas pela citometria de fluxo e as demais características espermáticas avaliadas tanto pelo	

convencional, sondas fluorescentes, CASA e citometria de fluxo, sendo colocados unicamente as características que tiveram significância estatística	131
Tabela 37 – Coeficientes de correlação de Spearman entre a intensidade de fluorescência da sonda Dihidroetidium (DHEi) avaliada pela citometria de fluxo e as demais características espermáticas avaliadas tanto pelo convencional, sondas fluorescentes, CASA e citometria de fluxo, sendo colocados unicamente as características que tiveram significância estatística	131
Tabela 38 – Coeficientes de correlação de Spearman entre porcentagem de células com DAF positivo e membrana íntegra (DAF-MI) avaliada pela citometria de fluxo e as demais características espermáticas avaliadas tanto pelo convencional, sondas fluorescentes, CASA e citometria de fluxo	132
Tabela 39 – Coeficientes de correlação de Spearman entre a intensidade de fluorescência da sonda Dihidrorodamina (DHRi) avaliada pela citometria de fluxo e as demais características espermáticas avaliadas tanto pelo convencional, sondas fluorescentes, CASA e citometria de fluxo	132
Tabela 40 – Descrição da média ($\pm$ Erro padrão) das variáveis para cada subpopulação espermática (SBP1, SBP2, SBP3 e SBP4) no grupo de partidas de sêmen de touros de Alta fertilidade	150
Tabela 41 – Descrição da média ($\pm$ Erro padrão) das variáveis para cada subpopulação espermática (SBP1, SBP2, SBP3 e SBP4) no grupo de partidas de sêmen de touros de Baixa fertilidade.....	150
Tabela 42 – Descrição da frequência de cada subpopulação espermática (SBP1, SBP2, SBP3 e SBP4) e as médias (pixels) das variáveis escolhidas por partida de sêmen criopreservadas de touros	151
Tabela 43 – Descrição da média ($\pm$ Erro padrão) da distribuição das subpopulações espermáticas (SBP1, SBP2, SBP3 e SBP4) para cada característica (Área, Perímetro, Altura, Circunferência), dentro de cada subpopulação (<i>cluster</i>) para os grupos de partidas de sêmen criopreservado bovino de alto e baixo escore de fertilidade (Escore)	153

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Produção fisiológica de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pela mitocôndria espermática	40
Figura 2 – Estrutura química do Dihidroetidium (DHE) e do Mitosox Red (MSR) e reação química com o ânion superóxido.....	43
Figura 3 – Representação esquemática das reações químicas do NO a partir da formação de DAF-2T. DAF-2 DA.....	45
Figura 4 – Propriedades da sonda fluorescente C11-BODIPY ^{581/591} durante o ataque das espécies reativas de oxigênio	47
Figura 5 – Gráfico de pontos (<i>Dot plot</i>) e histogramas gerados pela análise por citometria de fluxo na avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal. A. <i>Dot-plot</i> Side scatter (SSC) x forward scatter (FSC) mostrando o “Gate” de espermatozoides B. Histograma os espermatozoides mostrando no FL4-A as partículas marcadas com SYTO-59. C. <i>Dot-plot</i> observando as quatro subpopulações (AIML, ARML, AIMI, ARMI)	86
Figura 6 – Gráfico de pontos (<i>Dot plot</i>) gerados pela análise por citometria de fluxo na avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$). A. <i>Dot-plot</i> mostrando a detecção das quatro subpopulações espermáticas (MLLP, MLHP, MILP, MIHP) geradas pela combinação da fluorescência laranja do JC-1 com leitura no filtro FL2-A (eixo y) e a fluorescência do PI com leitura no FL3-A.(eixo x) B. <i>Dot-plot</i> do quadrante 2 (Q2) mostrando a os espermatozoides positivos para a fluorescência dos monômeros do JC-1 no FL1-A	88
Figura 7 – Histograma e gráfico de pontos (<i>Dot plot</i>) gerados pela análise por citometria de fluxo na avaliação da produção de anião superóxido A. Histograma da população de células positivas e negativas para Mitosox Red (MSR), a intensidade de fluorescência detectada pelo FL2-A B. <i>Dot-plot</i> da porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra (YOPRO-1 negativo).....	89
Figura 8 – Histograma da análise da produção de espécies reativas citoplasmáticas com Dihidroetidium (DHE), mostrando a população de células positivas e negativas para DHE, a intensidade de fluorescência detectada pelo FL2-A	89
Figura 9 – Histograma da análise da peroxidação lipídica por citometria de fluxo, mostrando a população de células positivas e negativas para BODIPY581/591	90
Figura 10 – Histograma gerado pela análise por citometria de fluxo da produção de espécies reativas de nitrogênio (peroxinitrito - ONOO ⁻ e derivados) mostrando a população de células positivas e negativas para DHRi no FL1-A	91
Figura 11 – Gráfico de pontos gerados pela análise por citometria de fluxo da produção de óxido nítrico pela sonda 4,5-diaminofluorescein-2/diacetate (DAF2-DA). A. Histograma da população de células positivas e negativas para DAF2-DA. B. <i>Dot-plot</i> da porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra e marcados positivamente para DAF (DAF-MI)	92
Figura 12 – Representação gráfica do protocolo de sincronização das vacas Nelore e momento da inseminação artificial em tempo fixo (IATF)	112
Figura 13 – Interfase da barra de ferramentas do programa Image J mostrando a ferramenta de seleção retangular	147
Figura 14 – Conjunto de mensurações para a análise morfométrica da cabeça do espermatozoide	148
Figura 15 – Dispersão das subpopulações das duas primeiras variáveis canônicas (Can 1 e 2) A. Descrição das subpopulações (cluster) do grupo de alto escore de fertilidade (FERT=A) B. Descrição das subpopulações (cluster) do grupo de baixo escore de fertilidade (FERT=B).....	151

Figura 16 – Dispersão das subpopulações das duas primeiras variáveis canônicas (Can 1 e 2) para cada touro, mostrando uma cor diferente para cada subpopulação (Cluster) 152

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Critérios de avaliação convencional do sêmen bovino congelado.....	34
Quadro 2 – Descrição dos pontos outorgados a cada característica espermático definido pela análise convencional.	61
Quadro 3 – Descrição dos valores obtidos dos quartis para as características espermáticas obtidas por sondas fluorescentes (PIAIA) e CASA (MP, VCL, VSL, VAP).....	63
Quadro 4 – Interpretação dos valores do Kappa.....	64
Quadro 5 – Descrição das notas e das categorias dadas a cada partida de sêmen segundo a alta qualidade (A), boa qualidade (B), qualidade questionável (Q).....	64
Quadro 6 – Determinação da qualidade das partidas em Alta qualidade (A), Boa qualidade (B) e Questionável (Q) pelos três métodos utilizados: análise convencional, PIAIA e CASA	70
Quadro 7 – Descrição das partidas de sêmen bovino, escore de fertilidade e taxa de prenhez do grupo de Alta (A) e Baixa (B) fertilidade	Erro! Indicador não definido.
Quadro 8 – Características do equipamento de citometria de fluxo Accuri C6 e descrição das sondas fluorescentes utilizadas nas análises	85
Quadro 9 – Populações espermáticas de acordo com a sonda utilizada para avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal na citometria de fluxo.....	86
Quadro 10 –Populações espermáticas obtidas pela citometria de fluxo utilizando as sondas JC-1 e Iodeto de propideo ()	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALH	Amplitude de deslocamento lateral de cabeça (μm)
ASBIA	Associação Brasileira de Inseminação Artificial
ATP	Adenosina Trifosfato
BCF	Frequência de batimentos (Hz).
BD	C11-BODIPY (581/591)
BE	Benzoato de estradiol
BSA	Albumina serica bovina
C11-BODIPY581/591	4,4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3 ^a ,4 ^a -diazas-indacene-3-undecanoic acid
Ca ²⁺	Íon calcio
CASA	Sistema computadorizado de avaliação da motilidade espermática
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CE	Cipionato de estradiol
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CH ₂	Grupo metileno
DAF	4,5-diaminofluorescein-2/diacetate
DAF- 2DA	2-diacetato diaminofluoresceína
DAF-2	3,4-diaminofluoresceína
DAF-2T	Triazolodiaminofluoresceína
DHE	Dihidroetidium
DHR	Dihidrorodamina
DIC	Contraste diferencial de fase
DNA	Ácido desoxirribonucléico espécies
ECC	Escore de condição corporal
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
EP	Erro padrão da media
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FITC-PNA	Lectina obtida de <i>Arachis hypogaea</i> (PNA), conjugada com FITC Aglutinina de <i>Pisum sativum</i> conjugada com isotiocionato de fluoresceína
FITC-PSA	
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H33342	Hoechst 33342
H342	Hoescht 33342
HE	Hidroetidium
Hz	Hertz
IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IP	

JC-1	Iodeto de 5,5',6,6'tetracloro 1,1',3,3'tetraetilbenzimidazolil carbocianina
JC-1	Iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'- tetraetilbenzimidazolilcarbocianina
LIN	Linearidade (%)
MFI	Intensidad media de fluorescencia
mg	Miligrama
min	Minuto
nm	Nanômetro
NO	Oxido nitrico
NOS	Oxido nítrico sintase
O ₂ -•	Ânion superóxido
OH-	Radical hidroxil
ONOO-	Radical hidroxila
p	Nível de significância
P ₄	Progesterona
PGF ₂ α	Prostaglandina
PI	Iodeto de propideo
PI	Iodeto de propideum
PIAIA	Integridade de membranas plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial
PKA	Proteína quinase A
PNA	Lectina obtida de <i>Arachis hypogaea</i>
PROC	Procedimento
PSA	Aglutinina de <i>Pisum sativum</i>
RO•	Alcoxil
ROO-	Peroxil
SAS	Statistical Analysis System
SOD	Superóxido Dismutase
STR	Retilinearida de (%).
TALP	Meio de Tyrode suplementado com albumina, lactato e piruvato
ua	Unidades arbitrarías
VAP	Velocidade de trajeto ($\mu\text{m/s}$)
VCL	Velocidade curvilínear ($\mu\text{m/s}$).
VSL	Velocidade progressiva ($\mu\text{m/s}$).
YOPRO	YO-PRO®-1
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μm	Micrômetro
2-OH-E ⁺	2-Hidroetídium

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	27
2	REVISÃO DE LITERATURA	30
2.1	FERTILIDADE DA FÊMEA BOVINA	30
2.2	FERTILIDADE DO TOURO	31
2.3	PREDIÇÃO DO POTENCIAL DE FERTILIDADE.....	32
2.4	TÉCNICAS DE AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA	33
2.4.1	Análises convencionais	33
2.4.2	Avaliação computadorizada da motilidade espermática	35
2.4.3	Análises espermáticas usando sondas fluorescentes	37
2.5	MORFOMETRIA ESPERMÁTICA.....	48
2.5.1	Programa Imagem J	50
3	HIPÓTESES E OBJETIVOS	52
3.1	ARTIGO 1.....	52
3.1.1	Hipóteses.....	52
3.1.2	Objetivos.....	52
3.2	ARTIGO 2.....	53
3.2.1	Hipóteses.....	53
3.2.2	Objetivos.....	53
3.3	ARTIGO 3.....	54
3.3.1	Hipóteses.....	54
3.3.2	Objetivos.....	54
3.4	ARTIGO 4.....	55
3.4.1	Hipóteses.....	55
3.4.2	Objetivos.....	55
4	ARTIGO 1: ASSOCIAÇÃO DE TÉCNICAS DE AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA MELHORA O CONTROLE DE QUALIDADE DE PARTIDAS DE SÊMEN BOVINO	57
4.1	INTRODUÇÃO	57
4.2	MATERIAL E MÉTODOS	58
4.2.1	Local.....	58
4.2.2	Partidas de sêmen	58
4.2.3	Avaliações convencionais do sêmen	59
4.2.4	Análise computadorizada do movimento espermático.....	59
4.2.5	Análise das membranas espermáticas por sondas fluorescentes.....	60
4.2.6	Grupos de qualidade espermática	61
4.2.7	Teste de Concordância	62

4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	63
4.4	RESULTADOS	64
4.4.1	Resultados da análise de variância entre categorias.....	66
4.4.2	Resultados da correlação entre características espermáticos.....	68
4.4.3	Resultados da distribuição das partidas por modelos de avaliação	69
4.4.4	Resultados do teste de concordância.....	71
4.5	DISCUSSÃO.....	74
4.6	CONCLUSÕES.....	77
5	ARTIGO 2. INFLUÊNCIA DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO DO ESPERMATOZOIDE SOBRE OS ÍNDICES DE FERTILIDADE <i>IN VIVO</i>	79
5.1	INTRODUÇÃO	79
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	Erro! Indicador não definido.
5.2.1	Reagentes.....	81
5.2.2	Partidas de sêmen e determinação da fertilidade	81
5.2.3	Análises laboratoriais do sêmen	82
5.3	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	92
5.4	RESULTADOS	93
5.4.1	Estatística descritiva.....	93
5.4.2	Estatística da separação por quartis	96
5.4.3	Correlações da taxa de prenhez com análises convencionais e análises objetivas	99
5.5	DISCUSSÃO.....	100
5.6	CONCLUSÕES.....	106
6	ARTIGO 3. RELAÇÃO ENTRE AS CARACTERÍSTICAS DE QUALIDADE ESPERMÁTICA DE PARTIDAS DE SÊMEN BOVINO E A FERTILIDADE <i>IN VIVO</i>: CONTRIBUIÇÃO DOS MARCADORES MITOCONDRIAIS	109
6.1	INTRODUÇÃO	109
6.2	MATERIAL E MÉTODOS	110
6.2.1	Local e período experimental	110
6.2.2	Touros e Partidas de sêmen	111
6.2.3	Critérios para seleção do sêmen usado na IATF	111
6.2.4	Animais e protocolo para inseminação artificial em tempo fixo (IATF)	111
6.2.5	Diagnóstico de gestação.....	112
6.2.6	Análises laboratoriais do sêmen	113
6.3	DIAGRAMA DA SEQUENCIA EXPERIMENTAL.....	119
6.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	121
6.5	RESULTADOS	122
6.5.1	Estatística descritiva.....	122
6.5.2	Distribuição por quartis	127

6.5.3	Correlações estatísticas	130
6.6	DISCUSSÃO.....	133
6.7	CONCLUSÕES.....	142
7	ARTIGO 4. SUBPOPULAÇÕES ESPERMÁTICAS DEFINIDAS PELA MORFOMETRIA DA CABEÇA DO ESPERMATOZOIDE EM SÊMEN DE TOUROS COM ALTA E BAIXA FERTILIDADE	144
7.1	INTRODUÇÃO	144
7.2	MATERIAL E MÉTODOS	146
7.2.1	Partidas de sêmen e processamento do sêmen	146
7.2.2	Preparação da amostra para análise morfométrica	146
7.2.3	Processamento das imagens no Image J	147
7.3	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	148
7.4	RESULTADOS	149
7.5	DISCUSSÃO.....	154
7.6	CONCLUSÕES.....	155
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	156
9	REFERÊNCIAS.....	158
10	APÊNDICES	171

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui uma série de condições favoráveis que o caracteriza como um dos países com maior potencial para a produção de carne de forma sustentável. O fator limitante para o crescimento da pecuária sustentável é a baixa eficiência reprodutiva dos rebanhos (BARUSELLI et al., 2013). O rebanho é constituído de 65,5 milhões de vacas e 15 milhões de novilhas em idade reprodutiva (ANUALPEC, 2015), com prevalência de aproximadamente 80% de sangue zebu (*Bos indicus*) criadas, na sua grande maioria a pasto, em sistema de criação extensivo, com baixa taxa de detecção de cio e baixa eficiência dos programas de inseminação artificial (NOGUEIRA et al., 2011). Desta forma, a IATF, sem a necessidade de detecção de cio, fornece uma abordagem organizada para incrementar o uso da inseminação artificial (IA) e melhorar a eficiência reprodutiva em rebanhos de corte (SÁ FILHO et al., 2010).

Em 2015 em torno de 13,7 milhões de fêmeas foram sincronizadas para IATF, correspondendo a cerca de 12% do rebanho de fêmeas existentes no Brasil e responde por 77% das inseminações artificiais realizadas no Brasil (BARUSELLI, 2016). A meta da ASBIA é chegar nos próximos anos a 15% de IATF nas fêmeas em idade reprodutiva. Esse crescimento de três pontos percentuais significa agregar mais três milhões de doses de sêmen ao volume comercializado anualmente, que hoje é de mais de 12 milhões (ASBIA, 2016). Sendo assim, a qualidade do sêmen ganha cada vez mais importância dentro do cenário das novas biotécnicas aplicadas à reprodução animal.

A fertilidade é um dos fatores mais críticos que controlam o desempenho biológico e financeiro dos sistemas de produção animal (FEUGANG et al., 2010). Especialmente na pecuária bovina, a fertilidade é um dos índices mais importantes de eficiência reprodutiva, associada com a rentabilidade e produtividade de um rebanho (VALOUR et al., 2015).

Por ser um processo multifatorial, a fertilidade envolve fatores do macho, da fêmea e do ambiente, assim como da gestão do programa de inseminação artificial (SELLEM et al., 2015). Assim, para estimar o sucesso da reprodução deve-se levar em consideração vários destes fatores, bem como suas interações, o que torna difícil obter uma estimativa precisa, apesar de ser o objetivo de produtores e pesquisadores. Os fatores relacionados com a fêmea têm sido amplamente estudados. Por outro lado, há mais de 50 anos o dogma evoluiu para o estudo do macho e da relação entre a qualidade espermática e a fertilidade (AMANN; HAMMERSTEDT, 2002). A influência da qualidade do sêmen bovino congelado sobre a

fertilidade é outro fator importante na indústria bovina (SAACKE, 1983; AMANN, 1989), devido ao sucesso nos programas de inseminação artificial (IA) e o crescente emprego da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) que estão sujeitos ao uso de sêmen de touros férteis e com boa qualidade seminal após a descongelação (BÓ; CUTAIA, 2005; LI et al., 2014).

O método mais representativo para avaliar o potencial fecundante do sêmen é pelos resultados obtidos da fertilidade *in vivo*. No entanto, é difícil aplicar este método na rotina pelo custo e tempo requerido (AL NAIB et al., 2011; MORADO et al., 2015). A fertilidade do macho está intrinsecamente ligada à qualidade do sêmen, porém, o método de predição da fertilidade de uma amostra seminal *in vitro* não é simples, sendo que diferentes características do sêmen podem limitar o potencial fecundante (AMANN, 1989). Fatores dependentes do indivíduo, do próprio espermatozoide, de como o sêmen foi processado e de como a amostra foi avaliada podem influenciar na predição da fertilidade de uma amostra de sêmen (AMANN; HAMMERSTEDT, 1993; VINCENT et al., 2012). Estimativas ou predições do potencial de fertilidade do sêmen tem sido difíceis, principalmente pela heterogeneidade do ejaculado, devido à presença de distintas subpopulações com diferentes características funcionais dentro do ejaculado, que podem contribuir no processo de fecundação (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2006). A presença de subpopulações de espermatozoides com características específicas são necessárias para que a fecundação aconteça (FERRAZ et al., 2014).

No tocante da qualidade espermática para estimar a fertilidade dos touros e das partidas de sêmen a serem usadas na IA se requer especial atenção ao uso de testes laboratoriais objetivos para a análise em conjunto de todas as características morfofuncionais e moleculares do espermatozoide. Durante as últimas décadas vários trabalhos foram realizados para buscar marcadores moleculares e celulares como ferramenta de avaliação *in vitro* de amostras de sêmen, mas os resultados são contraditórios (KILLIAN; CHAPMAN; ROGOWSKI, 1993; ZHANG et al., 1999; TARTAGLIONE; RITTA, 2004; BERLINGUER et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2013a; SELLEM et al., 2015; BATTUT, 2016). Os trabalhos mais recentes incluem a citometria de fluxo, pois esta permite analisar simultaneamente diferentes compartimentos e funções espermáticas em uma amostra mais representativa (HOSSAIN et al., 2011; PEÑA, 2015).

A peça intermediária é o compartimento espermático onde se encontram as mitocôndrias, que cumprem um papel central no comando de várias funções espermáticas. Existem biomarcadores mitocondriais que são importantes indicadores de sua função. Por

exemplo, a produção de energia pela síntese de ATP na mitocôndria requer potencial de membrana mitocondrial, este potencial também é requerido para a homeostase do cálcio e apoptose; portanto, o potencial mitocondrial é o principal biomarcador mitocondrial (ZHANG et al., 2017). O funcionamento mitocondrial é crucial para os espermatozoides, sendo altamente relacionado com altas taxas de funcionalidade e fertilidade da célula espermática (SOUSA et al., 2011).

Neste contexto, com o surgimento de novas técnicas e equipamentos mais sofisticados para análise de sêmen e dada a importância de aprofundar o estudo da mitocôndria e da função espermática em geral, o presente trabalho teve por objetivo identificar as características espermáticas relacionadas à função e à qualidade seminal para garantir um alto potencial de fertilidade. Para isso, foram testadas técnicas de avaliações convencionais e objetivas, incluindo a citometria de fluxo e software para determinação de subpopulações espermáticas, com o intuito de obter objetividade, acurácia e maior segurança dos resultados, além de aprofundar o conhecimento da fisiologia espermática e do potencial de fertilidade de partidas de sêmen usadas na IATF.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A presente revisão aborda a fertilidade em bovinos, direcionada para a qualidade do sêmen como um dos fatores que influenciam no sucesso da IA, e reúne as técnicas de avaliação seminal *in vitro*, que tem como objetivo determinar a qualidade de uma amostra de sêmen e estimar o seu potencial de fertilidade a campo. Partindo do conceito que o espermatozoide é uma célula complexa que deve passar por vários eventos para ser fértil. O grande desafio está em conhecer as características espermáticas que são pré-requisito para o sucesso da fertilidade. O principal limitante são as técnicas de avaliação seminal que ainda são insuficientes, seja pela subjetividade das técnicas, pela heterogeneidade do sêmen, ou porque devem ser considerados muitas outras características do espermatozoide além da integridade das membranas e o DNA, por exemplo as mitocôndrias estão sendo organelas com domínio sobre várias funções espermáticas.

2.1 FERTILIDADE DA FÊMEA BOVINA

A fertilidade é estimada pela taxa de fecundação, que é a taxa de fusão dos gametas feminino e masculino (GADELLA; LUNA, 2014). É comum que a taxa de fecundação não possa ser medida em bovinos, devido à mortalidade embrionária; sem embriões ou ovócitos colhidos dentro de poucos dias da inseminação, é impossível distinguir entre falha da fecundação e mortalidade embrionária (DEJARNETTE; NEBEL; MARSHALL, 2016).

A taxa de concepção é definida como o número de fêmeas diagnosticadas como positivas por métodos de diagnóstico convencionais (palpação transretal, ultrassonografia, teste hormonal) dividido pelo número de vacas que ovularam (SÁ FILHO et al., 2009). A taxa de concepção não pode explicar a morte embrionária ou fetal que poderia ocorrer posteriormente. No entanto, com a finalidade de estimar o potencial de fertilidade do touro, a taxa de concepção seria a mais precisa (DEJARNETTE; NEBEL; MARSHALL, 2016).

A taxa de prenhez (TP) é a estimativa usada comumente para determinar os índices reprodutivos. É considerado o número de fêmeas positivas ao diagnóstico de gestação no período de tempo definido dividido pelo número de fêmeas elegíveis para reprodução durante o período de tempo definido (DEJARNETTE; NEBEL; MARSHALL, 2016). A taxa de

fecundação em bovinos é de aproximadamente 90%, com a perda embrionária precoce nos primeiros 40 dias respondendo por 30% a 40% das perdas totais (HOELKER et al., 2012). Uma das questões mais importantes que afetam negativamente a reprodução bovina é a mortalidade precoce embrionária (ULBRICH et al., 2010).

Em bovinos de corte, aproximadamente 40-60% de fêmeas inseminadas ficam gestantes após o primeiro ciclo de IATF, com ligeiras variações nas taxas de prenhez dependendo de vários fatores, tais como os animais, gestão agrícola, escore de condição corporal, tempo pós-parto, tratamentos hormonais (MARQUES et al., 2015). A taxa de concepção após a primeira IATF encontrada em novilhas é de 57%, enquanto para vacas primíparas de 51% e vacas pluríparas de 56% (MARQUES et al., 2015). Outros fatores correlacionados com o sucesso de protocolos de IATF, são os fatores inerentes à fisiologia da fêmea, como o escore de condição corporal (ECC), raça animal, categoria de animais (novilhas ou vacas, primíparas ou múltiparas), amamentação, tamanho do folículo ovulatório, momento da inseminação em relação à ovulação e eficiente protocolo de sincronização; fazenda e o inseminador (SÁ FILHO et al., 2009; OLIVEIRA, 2012).

2.2 FERTILIDADE DO TOURO

Um dos fatores determinantes da eficiência reprodutiva de um sistema de produção de bovinos de corte é a fertilidade dos touros (OLIVEIRA et al., 2011). Há uma variação considerável na fertilidade (ou seja, no desempenho reprodutivo) entre touros, que pode levar a grandes perdas econômicas para a pecuária bovina (PARK et al., 2012).

Alguns autores demonstraram que o sêmen utilizado na IATF tem um grande impacto sobre a TP (CORREA; PACE; ZAVOS, 1997; ANDERSSON et al., 2004; SÁ FILHO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2013, 2014; NOGUEIRA et al., 2014). A diminuição da fertilidade é uma condição multifatorial, portanto, muito difícil de diagnosticar. Touros podem ter baixa fertilidade, mesmo quando as características reprodutivas clássicas são normais (MISHRA et al., 2013). A fertilidade varia substancialmente entre os touros. Em geral, os métodos para estimar a fertilidade são melhores para a identificação de touros com baixa fertilidade do que para classificar touros com boa ou excelente fertilidade (KASTELIC, 2013). Touros de baixa e alta fertilidade podem não apresentar diferenças nas avaliações convencionais em termos de concentração espermática e motilidade progressiva, apresentando melhor correlação com

fertilidade quando realizados testes funcionais (CORREA; PACE; ZAVOS, 1997). Assim, avaliações convencionais não determinam a capacidade do espermatozoide de interagir com o oócito, fertilizar e desenvolver o embrião (BERLINGUER et al., 2009; VINCENT et al., 2012; LI et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2014). Embora os espermatozoides possam sobreviver ao processo de criopreservação e apresentar boa motilidade eles podem não ter potencial de fertilidade. Essa subfertilidade é consequência de várias mudanças funcionais induzidas pela criopreservação (WATSON, 1995). Deve considerar-se também, que um ejaculado de touro que contém entre 800 milhões a 2 bilhões de espermatozoides/mL apresenta uma população heterogênea de células de diferentes qualidades e só alguns poucos espermatozoides contém as características necessárias para garantir a fertilidade. Um objetivo dos andrologistas é determinar como estas características impactam na fertilidade, através de estudos aprofundados da estrutura, ultraestrutura, função e bioquímica dos diversos componentes do espermatozoide.

Uma lista de características necessários para a fertilização foi relatada por Amann e Hammerstedt (1993), segundo estes autores, o espermatozoide deverá expressar estas características no tempo e local apropriado para atingir a fertilização. As características são: morfologia espermática aceitável, metabolismo para produção de energia, motilidade progressiva, capacidade para hiperativar a motilidade, conteúdo de lipídeos na membrana, estabilidade da membrana plasmática e acrossomal, atividade enzimática de fosfolipases, capacidade de realizar reação acrossomal, fatores imunossupressores, ligação nos reservatórios espermáticos no útero, fatores inibidores da capacitação prematura e enzimas associadas com a fertilização. Assim, a fertilidade do sêmen depende da funcionalidade destas características sendo alguns mais factíveis de medir do que outras. Isso enfatiza que a avaliação do sêmen isoladamente, como tradicionalmente entendida, tem apenas valor limitado para estimativas de fertilidade (HOLT, 2005).

2.3 PREDIÇÃO DO POTENCIAL DE FERTILIDADE

Atualmente, tanto nos laboratórios de andrologia, centrais e a campo, a avaliação de amostra de sêmen inclui avaliações da motilidade, vigor, morfologia, concentração e em alguns casos alguns testes funcionais são realizados (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2013). Estimar a fertilidade de uma amostra de sêmen a partir da análise de algumas características

espermáticas por testes *in vitro* ainda são inconsistentes para estimar o potencial de fertilidade *in vivo* e sua capacidade para suportar os processos de congelamento e descongelamento (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2006). Seguindo esta afirmação Sellem et al. (2015) concordaram que a maneira mais acurada para estimar a fertilidade é por múltiplas avaliações da função espermática, reunindo integridade de membranas plasmática e acrossomal, potencial de energia, oxidação celular, integridade de cromatina e condensação da cromatina, utilizando ferramentas computadorizadas de avaliação e citometria de fluxo para estas análises. Pelo contrário Peddinti et al. (2008) encontraram que os defeitos que afetam a competência funcional dos espermatozoides (ou seja, que estão envolvidos na capacitação espermática, reação acrossomal, a interação espermatozoide-ócito) não foram preditores da fertilidade.

Os espermatozoides são células complexas que se tornam inférteis quando um dos vários fatores bioquímicos ou morfológicos se encontra afetado (SIQUEIRA et al., 2007). Arruda et al. (2011) consideram que nenhum teste isolado é capaz de estimar a fertilidade de uma amostra de sêmen, mas o exame de várias características pode determinar um maior potencial de fertilidade, uma vez que a maior parte dos problemas reside nas diferentes características que o espermatozoide deve possuir para fertilizar o ovócito. Os esforços têm sido postos na determinação dos melhores características a serem utilizados para estimar o potencial de fertilidade dos espermatozoides, sendo de consenso que a fertilidade é um processo multifatorial (BISSONNETTE et al., 2009).

2.4 TÉCNICAS DE AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA

2.4.1 Análises convencionais

Segundo os padrões convencionais, para a análise de sêmen deve incluir no mínimo a avaliação motilidade subjetiva e vigor com uso de microscópio óptico, morfologia espermática pela microscopia de contraste de fase e concentração por câmara de Neubauer.

O Grupo de Trabalho “Técnicas de Avaliação Espermática”, instituído pela Portaria do Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA), reunido em 2011, indicou os padrões mínimos para aprovação da comercialização de sêmen (ARRUDA et al.,

2015). O sêmen congelado que é utilizado nos programas de IA devem seguir esses padrões (Quadro 1), sendo que variações nessas características podem levar a diferenças no nível de fertilidade dos touros (OLIVEIRA et al., 2014).

O espermograma é baseado em uma bateria de exames convencionais para a maioria dos laboratórios de reprodução, complementares ao exame clínico, sendo de simples execução e de baixo custo, mas esses testes são apenas uma guia e geralmente examinam-se um ou poucos dos eventos relacionados à fecundação. Além disso, os resultados da análise do sêmen padrão podem ser muito subjetivos e propensos a variabilidade entre laboratórios e técnicos (BRITO, 2010).

Quadro 1– Critérios de avaliação convencional do sêmen bovino congelado.

Características	Valores
Volume da dose	>0,25 mL
Motilidade espermática progressiva	≥ 30,0 %
Vigor espermático	≥3,0
Para doses ~10 x 10 ⁶ ou mais de espermatozoides com motilidade progressiva	
Defeitos totais	≤ 30,0 %
Defeitos maiores	≤ 20,0 %

Fonte: CBRA - Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal (2013).

Desde o início da IA em bovinos, o principal método de avaliação da qualidade do sêmen tem sido uma avaliação visual da motilidade espermática (SAACKE; WHITE, 1972). Esta análise pelo uso de microscopia de luz convencional é padrão na maioria de centros de processamento de sêmen (VINCENT et al., 2012) e ainda é considerado como um dos aspectos mais informativos de análise de sêmen (CHRISTENSEN et al., 2005). Devido que a motilidade espermática é fundamental para que os espermatozoides alcancem o ambiente uterino e o local de fertilização (BERLINGUER et al., 2009). Apesar que, não é incomum, que os espermatozoides com excelente motilidade apresentem baixa fertilidade (SEIDEL, 2012). Os esforços ainda estão dirigidos em estabelecer os padrões mínimos de motilidade, viabilidade, morfologia e outras características de função espermática que determinam um sêmen de boa qualidade em relação ao potencial de fertilidade.

Morfologia espermática é uma das características espermáticas com maior efeito sobre a fertilidade em bovinos (GILLAN et al., 2008; GRAHAM et al. 1980). Pode ser

avaliada por diferentes métodos: microscopia de campo direito, pela técnica de eosina-nigrosina (EN) mediante a leitura de esfregaços corados, por microscopia de contraste de fase e por contraste de interferência diferencial (DIC) pela técnica de câmara húmida em solução de formol salino, sendo que o DIC apresenta maior precisão na determinação das alterações morfológicas (FRENEAU et al., 2010).

Embora a morfologia espermática afeta a fertilidade do sêmen, algumas alterações menores podem ser compensadas, o que significa que a fertilidade pode ser melhorada se mais espermatozoides são inseminados, enquanto outros defeitos espermáticos são incompensáveis e levam a redução da fertilidade (MOCÉ; GRAHAM, 2008).

A subjetividade das análises convencionais na predição da fertilidade da amostra tem sido questionada (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2013), tanto a motilidade espermática avaliada subjetivamente usando microscopia convencional, não era bem correlacionada com fertilidade *in vivo* e *in vitro*, devido à subjetividade das análises e também pela limitação do avaliador de diferenciar entre as características do movimento e velocidades que os espermatozoides apresentam (LIU et al. 1991), portanto, foram desenvolvidas avaliações mais criteriosas, porém, requerem veterinários treinados para a execução das técnicas e do manuseio dos equipamentos, tem a limitação do custo, baixa disponibilidade de equipamentos e técnicos bem treinados (ARRUDA et al., 2007).

2.4.2 Avaliação computadorizada da motilidade espermática

O sistema computadorizado de análise da motilidade espermática (*Computer-assisted sperm analysis* - CASA) surgiu como um método objetivo e específico para caracterizar a motilidade espermática com propósito de avaliar a fertilidade, sendo as primeiras publicações em humanos em 1986 e depois nas outras espécies (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002). Por exemplo, tem sido encontradas melhores correlações com fertilidade em bovinos (OLIVEIRA et al., 2013a; NAGY et al., 2015). Desde o primeiro sistema computadorizado de avaliação da motilidade espermática em 1985, tem surgido até hoje mais de 12 sistemas CASA usados para experimentação animal (AMANN; WABERSKI, 2014).

A análise computadorizada reduz significativamente as variações do técnico nos resultados de motilidade espermática e permite melhor discriminação de amostras do que a avaliação subjetiva da motilidade (BRITO, 2010). Estes sistemas têm forte poder em

discriminar as diferenças na cinética espermática de amostras seminais com diferentes tratamentos, sendo considerado crucial nas pesquisas. Também é o método de avaliação da motilidade mais usado pelos laboratórios de pesquisa para relacionar com a fertilidade, sendo a sua avaliação essencial em qualquer análise espermática (CARVALHO; SARTORI; DODE, 2014).

A correlação entre o movimento espermático e a fertilidade da amostra seminal já foi descrita tanto para avaliações subjetivas (JANUSKAUSKAS et al., 2000) quanto para avaliações computadorizadas (FARRELL et al., 1996; GILLAN et al., 2008). FARRELL et al. (1998) demonstraram que combinações de múltiplas variáveis obtidas na análise computadorizada do movimento espermático apresentaram maiores índices de correlação com a fertilidade a campo do que a avaliação de uma única variável avaliada pelo CASA. A análise computadorizada da motilidade proporciona boa acurácia para avaliar a motilidade espermática *in vitro* (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002) e boas correlações foram encontradas com taxa de não retorno ao cio ($r = 0,40$) aos 56 dias (JANUSKAUSKAS; JOHANNISSON; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003).

Não são claras quais das características do movimento espermático determinada pelo sistema CASA é capaz de estimar a fertilidade ou a taxa de fertilização. Apesar da grande controvérsia existente a respeito da correlação dos padrões de movimento espermático com os índices de fertilidade *in vivo*, são observadas diferenças significativas no padrão de movimento desempenhado por espermatozoides que alcançam altas e baixas taxas de fertilização (ARRUDA et al., 2011). Nesse sentido, algumas variáveis geradas pela técnica CASA, como a linearidade espermática, parecem apresentar maior correlação com fertilidade (VERSTEGEN; IGUER-OUADA; ONCLIN, 2002). Mas a associação de múltiplas variáveis de movimento pode ser mais eficiente para explicar a relação com fertilidade *in vivo* do que usar apenas uma característica de movimento espermático (FARRELL et al., 1996).

Amann e Waberski (2014) sugerem que a avaliação das características da motilidade espermática não pode estimar o potencial de fertilidade dos espermatozoides em uma determinada amostra que foi usada para IA. O sistema apresenta limitações na determinação das características da motilidade por diversos fatores, principalmente, quando a concentração não está entre 50 e 20×10^6 espermatozoides por mL, requerendo de diluições com meios específicos tipo soluções de TALP, outra dificuldade é quando as amostras apresentam partículas ou debris. No entanto, das características do CASA os mais informativos são o VCL e STR (VSL/VAP) para determinar se uma partida de sêmen tem qualidade

2.4.3 Análises espermáticas usando sondas fluorescentes

O potencial das sondas fluorescentes para avaliação das estruturas espermáticas foi conhecido há mais de 30 anos; as primeiras publicações foram de GARNER et al., 1986 (Revisado por HARRISON; VICKERS, 1990). Atualmente uma variedade de sondas fluorescentes tem sido usada isoladamente ou em associações em andrologia. A combinação de várias sondas fluorescentes possibilita a avaliação de diversos compartimentos espermáticos simultaneamente (ARRUDA et al., 2011). As sondas fluorescentes mais usadas para determinar a integridade da membrana do espermatozoide são as sondas que se ligam aos ácidos nucleicos e marcam positivamente os espermatozoides lesados. Estas são impermeáveis à membrana, portanto, só marcam espermatozoides com danos na membrana, entre estas sondas estão: o Iodeto de propídeo (PI), Ethidium-homodimero (EthD-1), Cianine Yo-pro (YOPRO) e o Hoechst 33258 (GILLAN; EVANS; MAXWELL, 2005).

2.4.3.1 Avaliação simultânea da integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial

A membrana plasmática é essencial para manter a função espermática (HARRISON; VICKERS, 1990). Hoje em dia, é bem conhecido que a integridade do conjunto de estruturas no espermatozoide, como as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial, é essencial para o processo de fecundação (CORREA; PACE; ZAVOS, 1997; OLIVEIRA et al., 2014). Foram desenvolvidas técnicas de avaliação simultânea associando sondas fluorescentes para análises da integridade de membrana plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial, estas sondas possuem a capacidade de se ligar a pontos específicos das células, permitindo um diagnóstico mais fácil e direto, na dependência de suas características físicas (CELEGHINI et al., 2007).

Oliveira et al. (2014) utilizando a técnica descrita por Celeghini et al. (2007), demonstraram que a avaliação da integridade de membranas plasmática, acrossomal e o potencial de mitocôndria é uma estimativa mais acurada para determinar o potencial de

fertilidade do que a avaliação da motilidade espermática, coincidindo com Tartaglione e Ritta (2004). Diferenças significativas na TP quando as amostras de sêmen apresentavam 44,5% de espermatozoides apresentando simultaneamente integridade de membrana plasmática e acrossomal e alto potencial mitocondrial (PIAIA) (TP de 64,7%) do que 8,5% de espermatozoides PIAIA (TP de 36,2%), mas ambos não diferiram do sêmen contendo 23% de espermatozoides PIAIA (50% de prenhez) (OLIVEIRA et al., 2014).

Outro estudo avaliando a fertilidade a campo de três touros mostraram que não houve diferença significativa entre touros para motilidade espermática, integridade de membranas e fertilidade (49,13%; 47,59% e 52,74%), no entanto, notaram que o touro que apresentou o menor valor de fertilidade, também mostrou valores numéricos inferiores ($P > 0,05$) para HOST, PIAIA, MPI e MAI (OLIVEIRA et al., 2012).

A correlação entre integridade de membranas espermáticas e fertilidade já foi reportada por vários autores (GILLAN; EVANS; MAXWELL, 2005). Tartaglione e Ritta (2004) demonstraram também que a combinação de testes de integridade e de funcionalidade da membrana espermática apresenta alto coeficiente de correlação ($R^2 = 0,78$) com a fertilidade *in vitro* de touros. Ainda, quando os resultados do teste de integridade de membranas plasmática e acrossomal foram incluídos nos modelos de regressão linear, maior coeficiente de correlação foi obtido ($R^2 = 0,82$). Os autores enfatizaram que quanto maior o número de avaliações espermáticas realizado maior é a capacidade de estimar a fertilidade do sêmen.

A integridade da membrana acrossomal também tem sido correlacionada com fertilidade (CORREA et al., 1997). O acrossoma está localizado na frente da cabeça espermática, e é formada por duas membranas que contêm glicoproteínas, açúcares e enzimas, tais como Hialuronidase e Acrosina (FLESCHE; GADELLA, 2000). Estas enzimas ajudam no processo de fertilização, participando da digestão da zona pelúcida e permitindo a entrada de material genético do espermatozoide no oócito (BARTH, OKO, 1989). A reação acrossomal é um processo posterior à capacitação espermática que acontece na tuba uterina. Portanto, acrossoma lesado indica incapacidade de realizar a reação acrossomal e fecundar o oócito, tornando os espermatozoides inviáveis (COOPER; YEUNG, 1998).

As aglutininas de *Psium sativum* (PSA), que se liga na matriz acrossomal e de *Arachis hypogaea* (PNA), que se liga às membranas exteriores do acrossoma são marcadores de lesão acrossomal (COOPER; YEUNG, 1998). O acrossoma intato impermeáveis as lecitinas, no entanto, se ligam quando o acrossoma está danificado e libera as enzimas acrossomais. O PNA se liga a glicoproteínas na membrana acrossomal externa e o PSA se liga aos

componentes da matriz enzimática do lúmen do acrossoma, especificamente ao α -manosidase, um açúcar que se encontra na matriz acrossomal (CROSS; MEIZEL, 1989).

Jankovičová et al. (2015) relatam que o sítio de ligação do PNA é controverso; enquanto, Mortimer e colaboradores (1987) e Aitken e Brindle (1993) relatam que o PNA se liga especificamente à membrana acrossomal externa de espermatozoides humanos; Carver-Ward et al. (1997) e Jankovičová et al. (2015) argumentaram que é mais provável que a ligação seja na membrana acrossomal interna. Padrões similares de coloração para a porcentagem de espermatozoides com acrossoma reagido foram vistos para PNA (33%) e PSA (34%) (JANKOVIČOVÁ et al. 2015).

2.4.3.2 Avaliação da função mitocondrial

A mitocôndria espermática do espermatozoide foi ignorada durante muito tempo, até que recentes pesquisas mostraram sua participação em diferentes eventos fisiológicos e patológicos (ORTEGA-FERRUSOLA et al., 2009). Das diferentes organelas espermáticas será destacada a mitocôndria nesta revisão por apresentar características particulares e estar envolvida em diferentes processos vitais para o espermatozoide, entre os quais estão: homeostase do cálcio, metabolismo celular, fosforilação oxidativa, produção de energia, estresse oxidativo e apoptose. Além disso, as mitocôndrias estão ativamente implicadas em outros processos, tais como a diferenciação celular, a geração de ROS e metabolismo do ferro (PIOMBONI et al., 2010; AMARAL et al., 2013). A ideia de que a mitocôndria desempenha um papel importante na etiologia da infertilidade masculina é relatada por alguns autores (RAMALHO-SANTOS et al., 2009; AMARAL; RAMALHO-SANTOS, 2010; AITKEN et al., 2012a; PEÑA et al., 2015).

As mitocôndrias espermáticas mostram características particulares. Em primeiro lugar, exclusivamente estas organelas estão confinadas na peça intermediária do espermatozoide, firmemente enrolada em torno do axonema e a parte principal da cauda espermática é desprovida de mitocôndrias e enriquecida com enzimas glicolíticas (PIOMBONI et al., 2012). As mitocôndrias são geralmente conhecidas como “usina de energia” da célula, pois desempenham um papel crucial na produção de ATP através do sofisticado mecanismo da fosforilação oxidativa ou OXPHOS (PIOMBONI et al., 2010). Outras vias metabólicas ocorrem no interior das mitocôndrias, tais como: o ciclo do ácido

cítrico (ou ciclo de Krebs), a descarboxilação oxidativa de α -cetoácidos, a β -oxidação de ácidos graxos, muitas reações do metabolismo dos aminoácidos e sínteses de pirimidinas. A disfunção da mitocôndria resulta no incremento da liberação de espécies reativas de oxigênio e depleção de antioxidantes levando a estresse oxidativo (PEÑA et al., 2015). O desenvolvimento de sondas específicas para espécies reativas de oxigênio mitocondriais (mROS) mostrou que a excessiva produção mROS resulta em peroxidação da membrana e perda da motilidade, somado ao alto conteúdo de ácidos graxos insaturados e danos ao DNA (KOPPERS; GARG; AITKEN, 2010) (Figura 1).

Figura 1 – Produção fisiológica de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pela mitocôndria espermática

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

Legenda: ROS: Espécies reativas de oxigênio, NO: Óxido nítrico, ONOO-: Peroxinitrito, MSR: Mitosox red, DAF: 4,5-diaminofluorescein-2/diacetate, DHR: Dihidrorodamida, PSA: Aglutinina de *Pisum sativum*, PNA: Lecitina obtida de *Arachis hypogaea*, PI: Iodeto de propídeo, O₂^{•-}: Ânion superóxido

2.4.3.2.1 Avaliação do potencial mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial (MMP) geralmente é usado como indicador de função mitocondrial, e os relatos sugerem que as subpopulações de espermatozoides com alto potencial mitocondrial podem ter melhor potencial de fertilidade (SOUSA et al., 2011). A heterogeneidade do ejaculado está relacionada com as diferenças em algumas características da mitocôndria. No ejaculado sempre coexistem espermatozoides com potencial mitocondrial e espermatozoides sem potencial mitocondrial (SOUSA et al., 2009).

A função mitocondrial é comumente monitorada usando sondas fluorescentes catiônicas que se acumulam na mitocôndria dependendo do potencial elétrico de transmembrana (potencial mitocondrial). Quando a mitocôndria está polarizada as diferentes sondas fluorescem em diferentes comprimentos de onda dependendo da natureza da sonda (PEÑA et al., 2015).

Diferentes corantes fluorescentes catiônicos podem ser utilizados para medir o potencial de membrana das células individuais porque o seu atributo essencial é a permeabilidade da membrana e baixa ligação à membrana. Os cátions são atraídos para o potencial negativo através da membrana mitocondrial interna e, assim, eles preferencialmente acumulam nas mitocôndrias em células vivas, pois são altamente eficientes na travessia das membranas hidrófobas (MARÍN-GARCÍA, 2013). O JC-1 (iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetil benzimidazolilcarbocianina) é uma sonda fluorescente conhecida pelas suas propriedades de discriminar alto e baixo potencial mitocondrial. A fluorescência é verde no seu estado monomérico e quando existe alto potencial mitocondrial ela passa a seu estado reduzido apresentando uma coloração vermelha e formando aglomerados conhecidos como J-agregados (AMARAL et al., 2013).

2.4.3.2.2 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio

Os espermatozoides, como qualquer outra célula em condições aeróbias, produzem espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo a maior parte originada da atividade metabólica normal, a fim de desempenhar a sua função fisiológica. Os ROS são reguladoras de muitas funções espermáticas (PEÑA et al., 2015), mas também são responsáveis por prejudicar a função espermática de mamíferos e parecem ser originadas a partir das mitocôndrias, mas também quando acumulam-se na mitocôndria podem danificar esta estrutura (AITKEN et al., 2012a). Dentre as ROS formadas, podemos citar o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de

hidrogênio (H_2O_2), os radicais hidroxil ($\text{OH}^\bullet$), hidroperoxil ($\text{HO}_2^\bullet$), peroxil ($\text{ROO}^\bullet$) e alcóxil ($\text{RO}^\bullet$), e ainda o ácido hipocloroso (HOCl) (SILVA; MARQUES; CHAVEIRO, 2010).

A maior produção de espécies reativas de oxigênio é na mitocôndria, produto da respiração celular, existindo um balanço entre o nível das ROS e a quantidade de antioxidantes produzidos (AITKEN et al., 2012a). Quantidades equilibradas das ROS e agentes antioxidantes são necessárias para fecundação, reação acrossomal, hiperactivação da motilidade e capacitação espermática (AITKEN; BAKER, 2006). O principal subproduto do metabolismo do oxigênio é o $\text{O}_2^{\bullet-}$, e cumpre um papel como segundo mensageiro reagindo com o $\text{NO}^\bullet$, e como um precursor de H_2O_2 outro segundo mensageiro. A detecção direta de superóxido intracelular é praticamente impossível devido à vida média curta e à rápida limpeza intracelular pelos antioxidantes (ZIELONKA; KALYANARAMAN, 2010). Uma intensa atividade mitocondrial pode ser refletida pelo incremento da produção de superóxido (PEÑA et al., 2015).

A produção de aldeídos hidrofílicos durante a peroxidação lipídica como o 4HNE pode ativar a produção de ROS mitocondrial em espermatozoides humanos, existindo de um circuito fechado de realimentação positiva através do qual os produtos metabólicos da peroxidação lipídica aumentam a geração de radicais livres pela mitocôndria (AITKEN et al., 2012b). Quando há um desequilíbrio entre ROS e os antioxidantes, gera-se estresse oxidativo, que lesa a célula espermática e leva a infertilidade (AITKEN; BAKER, 2006). Quando o espermatozoide é de má qualidade produz significativamente maior quantidade de ROS, detectando-se maior peroxidação lipídica, o que causa dano oxidativo aos DNAs nuclear e mitocondrial (SILVA et al., 2007). Os espermatozoides são potencialmente suscetíveis a danos causados pelo excesso de ROS devido à sua elevada quantidade de ácidos graxos poli-insaturados, fosfolípidios na membrana e pouco citoplasma. As ROS, além de induzir danos no DNA, podem promover a depleção da adenosina tri-fosfato (ATP) nas mitocôndrias, e causar perda de motilidade espermática, viabilidade e capacidade de fertilização (COCCHIA et al., 2011).

Espermatozoide produz $\text{O}_2^{\bullet-}$ e este radical de oxigênio foi correlacionado negativamente com função espermática (DE IULIIS et al., 2006). Uma sonda de escolha para a detecção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ intracelular é a Hidroetidina (HE) ou conhecida também como Dihidroetidium (DHE) (KOPPERS et al., 2008) (Figura 2). Esta sonda é permeável à célula, emite fluorescência azul quando não reagida; mas quando oxidada e hidroxilada pelo $\text{O}_2^{\bullet-}$ é convertida a 2-hydroxyethidium (2-OH-E^+) que emitem uma fluorescência vermelha pela ligação do etídio no DNA (DE IULIIS et al., 2006; KALYANARAMAN, 2011). No

espermatozoide de humano, a produção do $O_2^{\bullet-}$ que oxida o DHE não tem relação com a cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria (DE IULIIS et al., 2006).

Figura 2 – Estrutura química do Dihidroetidium (DHE) e do Mitosox Red (MSR) e reação química com o ânion superóxido

Fonte: HELD, P., 2012.

O Mitosox Red (MSR) ou também chamado Mito-HE, é um análogo da DHE, é lipossolúvel e com afinidade pela matriz mitocondrial, possui um catião trifenilfosfônio conjugado com HE (KOPPERS et al., 2008). As reações bioquímicas são similares as do DHE. O Mito-SOX reage com o $O_2^{\bullet-}$ e forma um produto hidroxilado, o 2-hydroxymitoethidium (2-OH-Mito-E⁺) que emite fluorescência vermelha (KALYANARAMAN et al., 2013). A fluorescência vermelha detectada a partir de células incubadas com HE ou Mito-SOX é equiparado à produção de $O_2^{\bullet-}$ intracelular o mitocondrial (KOPPERS et al., 2008; KALYANARAMAN, 2011). A produção de superóxido tem como fonte a mitocôndria espermática e pode ser medida com a sonda MitoSox red (MSR) (AITKEN et al., 2012a). Espermatozoides que produzem maior quantidade de superóxido podem ter mais mitocôndrias metabolicamente ativas (GIBB; LAMBOURNE; AITKEN, 2014). O superóxido está envolvido em muitas condições fisiológicas e patológicas e seu estudo contribui para a compreensão dos mecanismos moleculares de muitas alterações patológicas e permitindo o desenvolvimento de potencialmente novas estratégias de tratamento (ZIELONKA; KALYANARAMAN, 2010).

2.4.3.2.3 Avaliação da formação de óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é sintetizado a partir de L-arginina e O_2 pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) em quase todas as células de mamíferos, se caracteriza por ter uma vida média curta (DE LAMIRANDE; LAMOTHE, 2009). A formação simultânea de $O_2^{\cdot -}$ e NO produz peroxinitrito, um oxidante muito forte e agente de nitratação (DE LAMIRANDE; LAMOTHE, 2009). Atua como um vasodilatador, que resulta do fracionamento de arginina em citrulina numa reação catalisada por uma família de enzimas dependentes de NADPH chamadas NO sintase e é um regulador de funções mitocondriais (NISOLI; CARRUBA, 2006). A matriz mitocondrial contém uma forma única de síntese de NO (GHAFOURIFAR et al., 1999; NOHL; STANIEK; KOZLOV, 2005). A membrana interna mitocondrial contém uma isoforma de NOS (mtNOS) própria para produzir NO mitocondrial dependente da presença de Ca^{2+} (NISOLI; CARRUBA, 2006).

O NO é essencial na regulação da capacitação espermática e da reação acrosômica, estes dois processos precisam ser adquiridos pelos espermatozoides para atingir o potencial de fertilização, desempenha um papel importante na regulação, manutenção e hiperativação da motilidade (FRANCO, 2013). Além disso, tem sido recentemente demonstrado que a função mitocondrial está positivamente correlacionada com o potencial e a qualidade de fertilização espermática humana e que os precursores de NO e o NO propriamente, aumentam a motilidade espermática e a produção de energia nas mitocôndrias (BUZADZIC et al., 2014). Um dos mecanismos é o estímulo sobre a Guanilato ciclase e consequente aumento da fosforilação do aminoácido tirosina, assim, uma baixa concentração de NO é necessária para induzir a capacitação e fosforilação oxidativa (FRANCO, 2013). Porém, a redução do NO leva ao aumento da integridade da membrana plasmática e acrossomal de espermatozoides de equino (FRANCO, 2013). A produção de NO, no sêmen criopreservado de equinos, aumentou nos garanhões com boas características espermáticas pós-descongelamento. Demonstrando o papel positivo do NO na fisiologia espermática (FRANCO, 2013).

Embora o seu papel fisiológico ainda não seja claro, a formação de NO em mitocôndrias pode ter consequências importantes porque este composto liga-se aos grupos heme de citocromos (em particular citocromo oxidase) e inibe a respiração celular (PODEROSO et al., 1996). Isto pode, assim, estimular a formação de $O_2^{\cdot -}$ (por exemplo, do Complexo I), que por sua vez pode reagir com mais NO para formar peroxinitrito, um oxidante capaz de inibir enzimas importantes que afetam a integridade mitocondrial (PODEROSO et al., 1996).

A sonda mais utilizada é a 2-diacetato diaminofluoresceína (DAF- 2DA) (LAMPAIO; STRIJDOM; PLESSIS, 2006). O DAF-2DA é permeável na membrana plasmática e é um

indicador de NO em tempo real; quando modificado pela ação de esterases plasmáticas em 3,4-diaminofluoresceína (DAF-2). O DAF-2 é retido na célula e reage com o NO na presença de oxigênio (Figura 3). Esta reação produz o triazolodiaminofluoresceína (DAF-2T), um produto altamente fluorescente, que quando excitado a um comprimento de onda de 488nm emite uma fluorescência em 515nm, permitindo quantificar a formação de NO, representado na figura abaixo (PLANCHET e KAISER, 2006, revisado por Maciel, 2013).

Figura 3 – Representação esquemática das reações químicas do NO a partir da formação de DAF- 2T. DAF-2

Fonte: Maciel, 2013.

2.4.3.2.4 Avaliação da formação de espécies reativas de nitrogênio

Espécies reativas de nitrogênio (RNS) incluem dióxido de azoto (NO_2), peroxinitrito (ONOO^-) e NO (DOSHI et al., 2012). O peroxinitrito é um poderoso oxidante, gerado durante a capacitação espermática, é conhecido por inibir tirosina fosfatase e ativar a tirosina-quinase da família SRC, tornando-se particularmente um poderoso contribuinte para o processo de capacitação (AITKEN; CURRY, 2011). Os RNS também são importantes para vários processos fisiológicos, mas em excesso podem contribuir para o estresse nitrosativo, comprometendo a função espermática e especialmente a função mitocondrial (DOSHI et al., 2012). A fosforilação oxidativa da mitocôndria espermática e enzimas mitocondriais foram afetadas pelos níveis de peroxinitrito (URIBE et al., 2015). O equilíbrio entre RNS e antioxidantes é, sem dúvida, importante para uma variedade de funções no sistema

reprodutivo, tais como sinalização celular, regulação e produção de hormônios, capacitação, reação acrossomal, motilidade espermática e ligação na zona pelúcida (DOSHI et al., 2012).

Dihidrorhodamina (DHR) é uma sonda usada para medir ONOO^- nas células somáticas. Esta sonda é oxidada e convertida em seu subproduto fluorescente a rodamina. A oxidação de DHR à Rodamina é desencadeada por oxidantes ($\text{OH}^\bullet$, compostos I e II e NO_2). Portanto, a DHR pode ser utilizada apenas como um indicador não específico da formação de ONOO^- e HOCl intracelular (KALYANARAMAN et al., 2012).

A DHR é comumente usada para detectar radicais hidroxila ($\text{OH}^\bullet$), peroxinitrito (ONOO^-), nitrogendioxidradicais ($\text{NO}_2^\bullet$) e derivados de peroxidases. DHR é oxidada a Rodamina 123, que emite uma fluorescência verde, este composto é lipofílico, com carga positiva e se acumula na mitocôndria com alto potencial mitocondrial (GÜRLER HAKAN, 2015).

2.4.3.2.5 Avaliação da peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica é o processo através do qual os radicais livres capturam elétrons dos lipídios da membrana plasmática do espermatozoide. O alto grau de instauração desses lipídios no espermatozoide de bovino os torna excelentes alvos para a peroxidação lipídica (BROUWERS; GADELLA, 2003). O processo inicia quando os radicais livres abstraem um átomo de hidrogênio do grupo metileno ($-\text{CH}_2-$), deixando o carbono com um elétron não pareado formando um radical alquil ($-\dot{\text{C}}\text{H}-$), que por sua vez reage com o oxigênio para formar um radical peróxido ($-\text{ROO}^\bullet-$). Os radicais peróxido podem propagar a oxidação, abstraindo um átomo de hidrogênio de um ácido graxo insaturado vizinho, tornando-se assim um hidroperóxido lipídico ($-\text{ROOH}-$) e deixando o ácido graxo insaturado tornar-se um radical alquil. Sob a influência de metais de transição como ferro ou cobre é acelerado o processo de peroxidação (BROUWERS; SILVA; GADELLA, 2005).

A peroxidação lipídica pode ser quantificada e localizada após a coloração espermática com a sonda C11-BODIPY581/591 (BROUWERS; GADELLA, 2003). Esta sonda é um análogo dos ácidos graxos poli-insaturados sendo prontamente incorporada à membrana celular. A sua reatividade à peroxidação é comparável a dos ácidos graxos poli-insaturados. Quando intacta, esta sonda emite fluorescência vermelha, com comprimento de onda de 580 a 620 nm; porém, quando sofre peroxidação pelas ROS, torna-se verde, cujo

comprimento de onda é de 495 a 545 nm (Figura 4) (BROUWERS; SILVA; GADELLA, 2005). A alteração da emissão de fluorescência para verde indica a presença de espécies reativas de oxigênio na parte hidrofóbica da bicamada lipídica das membranas espermáticas. Por estas características, esta sonda torna-se uma técnica prática para detectar a peroxidação lipídica, podendo ser utilizada na citometria de fluxo ou em outros aparelhos com leitores a laser (SILVA; GADELLA, 2006).

Figura 4 – Propriedades da sonda fluorescente C11-BODIPY^{581/591} durante o ataque das espécies reativas de oxigênio

Fonte: BROUWERS; SILVA; GADELLA, 2005

A peroxidação ocorreu predominantemente na peça intermediária do espermatozoide, sugerindo o envolvimento das mitocôndrias e da cadeia de transporte de elétrons na geração de ROS (BROUWERS; GADELLA, 2003). A peroxidação lipídica não é homogeneamente distribuída sobre a célula espermática, sendo a mitocôndria mais propensa à oxidação (BROUWERS et al., 2011). O processo de criopreservação induz peroxidação lipídica em sêmen equino mas os níveis são baixos (0,25 a 1,9%), sendo mais evidente na peça intermediária do que na cabeça e cola espermática (ORTEGA FERRUSOLA et al., 2009).

A peroxidação, tal como relatada pela sonda fluorescente, corresponde claramente à presença de hidroxí- e hidroperoxi fosfatidilcolina nas membranas espermáticas, que são produtos de fase inicial da peroxidação lipídica (BROUWERS; GADELLA, 2003). Entre menos peroxidação lipídica maior a crioresistência do sêmen os processos de criopreservação. Porém a peroxidação lipídica alcança níveis significativos só quando

induzida com indutores pro-oxidantes (SILVA et al., 2007). A peroxidação espontânea da membrana espermática não foi resultado da morte celular, uma vez que apenas uma subpopulação pronunciada de células vivas apresentou peroxidação após o congelamento / descongelamento (BROUWERS; GADELLA, 2003). Somado aos achados de Raphael (2007) que relataram que a maior peroxidação lipídica, usando a sonda BODIPY^{581/591}, era relacionada ao maior metabolismo espermático e maior produção de EROS.

2.5 MORFOMETRIA ESPERMÁTICA

A população espermática de um determinado ejaculado é heterogênea por natureza, existindo diferença entre touros, entre ejaculados do mesmo touro e na mesma amostra coletada existem populações com diferentes estruturas e graus de funcionalidade (GARCÍA-ÁLVAREZ et al., 2014). A heterogeneidade do ejaculado pode ser identificada em diferentes aspectos, por exemplo, quando avaliada a motilidade já foram relatadas subpopulações em relação aos características cinéticos (MUIÑO et al., 2008; 2009). Existem subpopulações espermáticas agrupadas pela integridade de membranas e potencial mitocondrial determinadas pelo uso de sondas fluorescentes (CELEGHINI et al., 2007). Igualmente, tem-se evidenciado na análise morfométrica a presença de subpopulações espermáticas distribuídas de acordo com a dimensão e formato da cabeça (RUBIO-GUILLÉN et al., 2007; VALVERDE et al., 2016).

As variações morfométricas encontradas no ejaculado relatam as mudanças que sofreu o espermatozoide durante a espermatogênese e o processo de maturação epididimário, também podem ser reflexo dos danos que as células sofrem durante a criopreservação (RUBIO-GUILLÉN et al., 2007). Durante a formação no testículo as células espermatogônias passam por diferentes estágios até se diferenciar em espermatozoides altamente especializados principalmente por compactar seu DNA para transportá-lo íntegro até a fertilização. Mudanças da morfologia espermática podem relatar a condição dos túbulos seminíferos e do epidídimo (DE LUCIO et al., 2014) e indicar alteração do DNA espermático, instabilidade da cromatina e danos no plasmalema pelo estresse osmótico.

A origem destas subpopulações não é bem esclarecida, mas existe influência de genes atuando durante a espermatogênese e influenciando na anatomia do espermatozoide (RUBIO-GUILLÉN et al., 2007). Na análise morfométrica, a área do espermatozoide é a característica mais informativo (VALVERDE et al., 2016). Também foi relatado que a criopreservação leva a mudanças da morfometria da cabeça do espermatozoide, sendo a cabeça de menor

tamanho após a criopreservação em comparação ao sêmen fresco (GRAVANCE et al., 1998; RUBIO-GUILLÉN et al., 2007). A diminuição da subpopulação de espermatozoides com a cabeça grande e longa (SBP3) e aumento da subpopulação 2 (SBP2) caracterizada por espermatozoides com menores dimensões da cabeça, é devido a maior compactação da cromatina, em adição, a distribuição de frequência de espermatozoides dentro de cada subpopulação após a criopreservação varia entre machos (RUBIO-GUILLÉN et al., 2007), mostrando que alguns indivíduos são mais susceptíveis a criopreservação, sendo um bom marcador do potencial de congelabilidade. O impacto da criopreservação sobre a morfometria espermática varia entre touros, mas, um 20% dos touros não mostraram mudanças nas dimensões da cabeça espermática (GRAVANCE et al., 1998). Com respeito a fertilidade, ainda precisa ser definido se a variabilidade no tamanho da cabeça de espermatozoides de touro podem ser um indicativo de fertilidade (GRAVANCE et al., 1998).

Segundo as pesquisas recentes, a heterogeneidade das subpopulações espermáticas tem relevância funcional, principalmente com relação à fertilidade (YÁNIZ et al., 2016). O potencial de fertilidade do macho depende da heterogeneidade do ejaculado interagindo com o trato reprodutivo da fêmea em diferentes níveis (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2003).

Quando o estudo de fertilidade em relação às características espermáticas tem como base a média dos valores e considera o ejaculado como uma amostra homogênea perde-se a capacidade de predição (YÁNIZ et al., 2015). Assim, a identificação de subpopulações conduzida pela associação entre as análises computadorizadas e métodos estatísticos por *cluster* e análises discriminatórias para agrupar os espermatozoides pela similaridade morfométrica podem trazer mais informações da relação entre fertilidade e qualidade espermática (YÁNIZ et al., 2016). Touros com alta fertilidade produzem mais espermatozoides alongados e cônicos, no entanto, estas variações não são fáceis de ser identificadas pelo olho humano (VALVERDE et al., 2016). A relação entre morfometria da cabeça e fertilidade tem sido relatada em bovino (BELETTI; COSTA; GUARDIEIRO, 2005; SANTOS, 2016b; VALVERDE et al., 2016).

Um estudo mais recente determinou a presença de subpopulações espermáticas (SP) definidas por características de morfometria de cabeça de espermatozoides em sêmen congelado bovino da raça Nelore e sua influência na fertilização *in vitro* (SANTOS, 2016b). Partidas de sêmen congelado de diferentes touros, que à análise convencional estavam dentro do preconizado pelo CBRA (2013), mostraram 4 subpopulações morfometricamente bem definidas (SBP1, SBP2, SBP3 e SBP4), entre elas, a SBP4 corresponde aos espermatozoides com maior área da cabeça. A presença de maior percentual de SBP4 apresentou correlação

negativa ($r = -0,91$; $P < 0,05$) com a taxa de formação de pronúcleos o que diminui a fertilidade *in vitro* quando usado o sêmen desses touros (SANTOS, 2016b).

Entretanto, não existem estudos que determinem a influência destas subpopulações, de acordo com a morfometria, em partidas de sêmen usadas para IATF e sua relação com TP.

2.5.1 Programa Imagem J

O Image J é um software para processamento e análise de imagens, desenvolvido por Wayne Rasband no National Institute of Mental Health, USA, em linguagem Java. Com este software é possível exibir, editar, analisar, processar, salvar e imprimir imagens de 8, 16 e 32 bits. Permite o processamento de diversos formatos de imagem como TIFF, GIF, JPEG, BMP, DICOM e FITS (HANNICKEL et al., 2002).

O Image J é um software livre (freeware) que pode ser obtido gratuitamente no site <http://rsb.info.nih.gov/ij/>. Esse software é usado para análise de imagens. Possui várias ferramentas que podem ter utilidade em diversas áreas de conhecimento. No Image J, a imagem aberta na janela de imagens é analisada como se estivesse sobre um plano cartesiano formado, obviamente, por um eixo horizontal e outro vertical (respectivamente, chamados de eixos X e Y). O programa Image J permite a medida de comprimentos, áreas, intensidade de cores e uma série de outras informações que podem estar disponíveis na imagem. Para realizar medidas de comprimento, precisamos fornecer ao programa uma distância real que faz parte da imagem a ser trabalhada (http://www.pontociencia.org.br/pdf/tutorial_imagej.pdf).

As características morfométricas são:

- Área (Área) calibrada em pixels como padrão ou milímetros quadrados (mm^2) se a escala da imagem foi calibrada.
- Perímetro (P): A longitude do contorno da cabeça espermática (mm)
- Centróide: O ponto central da seleção. Esta é a média das coordenadas X e Y de todos os pixels da imagem ou da seleção. Representa os cabeçalhos das colunas X e Y dos resultados.

- Centro de Massa - Esta é a média ponderada de brilho das coordenadas X e Y de todos os pixels na imagem ou seleção. Utiliza os cabeçalhos XM e YM. Estas coordenadas são os momentos espaciais de primeira ordem.
- Retângulo: O menor retângulo que envolve a seleção. Usa os títulos BX, BY, largura e altura, onde BX e BY são as coordenadas do canto superior esquerdo do retângulo.
- Elipse - Coloca uma elipse na seleção. Usa os títulos Major, Menor e Angulo. Maior e Menor são o eixo primário e secundário da melhor elipse de montagem. Ângulo (0-180 graus) é o ângulo entre o eixo primário e uma linha paralela ao eixo x da imagem. As coordenadas do centro da elipse são exibidas como X e Y se o Centroide for verificado.
- Relação de aspecto (AR): eixo principal / eixo menor.
- Redondeza (Round): $4 * \text{área} / (\pi * \text{major_axis}^2)$, ou o inverso da relação de aspecto.): $4 * \text{área} / (\pi * \text{major_axis}^2)$, ou o inverso da relação de aspecto.
- Solidez: área/convexidade da área.
- Diâmetro de Feret - A distância mais longa entre quaisquer dois pontos ao longo do limite de seleção, também conhecido como calibre máximo.
- Elipticidade: $[\text{Altura (L)}/\text{Largura (W)}]$
- Circularidade $[4\pi A/P^2]$, um valor de 1,0 indica um círculo perfeito. À medida que o valor se aproxima de 0,0; indica uma forma cada vez mais alongada. Os valores podem não ser válidos para partículas muito pequenas.
- Elongação $[(L - W)/(L + W)]$
- Regularidade $[\pi LW/4A]$

3 HIPÓTESES E OBJETIVOS

Este estudo está apresentado em três artigos separados em capítulos que compõem esta tese, as hipóteses e os objetivos de cada artigo estão descritos a seguir.

3.1 ARTIGO 1

Associação de técnicas de avaliação de sêmen bovino para melhorar a capacidade de predição do potencial de fertilidade

3.1.1 Hipóteses

- A avaliação das características espermáticas convencionais, tais como motilidade, vigor e morfologia, apresentam concordância com as avaliações das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial por sondas fluorescentes e avaliações da motilidade pelo sistema computadorizado de análise espermática (CASA).
- Quanto mais avaliações realizadas em uma partida de sêmen, melhor o poder em estimar falhas no potencial de fertilidade *in vivo*.

3.1.2 Objetivos

- Determinar a qualidade espermática de partidas de sêmen bovino por diferentes métodos de avaliação laboratorial: análises convencionais (motilidade, vigor e morfologia), por sondas fluorescentes (membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial) e usando o sistema computadorizado de avaliação da motilidade espermática (CASA).
- Verificar a concordância entre os métodos de avaliação seminal para determinar a qualidade espermática.

3.2 ARTIGO 2

Influência das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio do espermatozoide sobre os índices de fertilidade *in vivo*

3.2.1 Hipóteses

- As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio influenciam positivamente na habilidade do espermatozoide para fecundar.
- O controle do metabolismo oxidativo do espermatozoide é eficiente em espermatozoides com maior potencial de fertilidade.
- A quantificação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio por citometria de fluxo são fatores chave para as estimativas de fertilidade de sêmen bovino.

3.2.2 Objetivos

- Descrever algumas características funcionais, estruturais e o metabolismo oxidativo no sêmen de touros de alto e baixo escore de fertilidade.
- Determinar a influência das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio do sêmen sobre a fertilidade *in vivo*.
- Relacionar as características de qualidade espermática com o índice de fertilidade *in vivo*.
- Comparar por valores de corte inferiores, médios e superiores da porcentagem de diferentes características espermáticas o impacto sobre a fertilidade após IATF.

3.3 ARTIGO 3

Relação entre as características de qualidade espermática de partidas de sêmen bovino e a fertilidade *in vivo*: contribuição dos marcadores mitocondriais.

3.3.1 Hipóteses

- Para atingir bons índices na taxa de prenhez em um programa de IATF é necessário usar sêmen selecionado mediante análises objetivas.
- Os biomarcadores mitocondriais são critérios apropriados para avaliar a função mitocondrial e permitem distinguir partidas de sêmen de melhor fertilidade. Alterações da integridade e função mitocondrial afetam outros processos fisiológicos do espermatozoide e impactam na fertilidade.
- O uso de citometria de fluxo na avaliação da qualidade de partidas de sêmen comercial proporciona informações mais acuradas da estrutura e função espermática e pode explicar as diferenças do potencial de fertilidade.

3.3.2 Objetivos

- Determinar as características espermáticas que influenciam na fertilidade *in vivo*.
- Associar as diferentes técnicas para avaliar a estrutura, integridade e função de diferentes organelas espermáticas e determinar os melhores preditores do potencial de fertilidade.
- Relacionar os marcadores mitocondriais com qualidade espermática e fertilidade *in vivo*.

3.4 ARTIGO 4

Subpopulações espermáticas definidas pela morfometria da cabeça do espermatozoide em sêmen de touros com alta e baixa fertilidade

3.4.1 Hipóteses

- Existem diversas subpopulações de espermatozoides no ejaculado de touros, que podem ser agrupadas pela morfometria da cabeça espermática e a distribuição destas subpopulações indica oscilações no potencial de fertilidade.

3.4.2 Objetivos

- Identificar as subpopulações espermáticas pela análise morfométrica de partidas de sêmen de bovinos com a relação com fertilidade *in vivo*.

4 ARTIGO 1: ASSOCIAÇÃO DE TÉCNICAS DE AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA MELHORA O CONTROLE DE QUALIDADE DE PARTIDAS DE SÊMEN BOVINO

4.1 INTRODUÇÃO

A tendência do mercado é o aumento da demanda de partidas de sêmen congelado de bovino, devido ao avanço das tecnologias de IA e IATF. Segundo as estatísticas o mercado geral de sêmen no Brasil teve um crescimento de 4,49% em 2014 ante o ano de 2013, o movimento total foi de 13.609.311 doses de sêmen destinadas para IA em 2014 (ASBIA, 2014). Sendo assim de grande relevância o controle de qualidade de partidas de sêmen nas centrais de reprodução, estes controles tem o propósito de diagnosticar a qualidade de uma amostra seminal que será comercializada. Os padrões mínimos para comercialização destas partidas foram estabelecidos pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento e estes exigem como mínimo a avaliação da motilidade, vigor, concentração e alterações morfológicas espermáticas com a finalidade comercializar o sêmen dentro dos mais apropriados padrões de qualidade sanitária e de fertilidade (CBRA, 2013). A motilidade é fundamental para que os espermatozoides alcancem o ambiente uterino e o local de fertilização, sendo o critério mais usado na avaliação de sêmen. No entanto, só uma característica espermática não explica a fertilidade a campo (OLIVEIRA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2014). Além disso, os resultados da análise do sêmen podem ser muito subjetivos e propensos a variabilidade entre laboratórios e técnicos (BRITO, 2010). Para contornar este problema surgiram técnicas mais objetivas.

Avaliação da cinética espermática por sistemas computadorizados tem sido muito úteis na pesquisa, mas não são usadas nos laboratórios comerciais com muita frequência, pela falta de definição dos critérios de avaliação da motilidade espermática que o sistema proporciona, a pesar que se conhece que estas características apresentam correlação com fertilidade a campo (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2003; OLIVEIRA et al., 2012). Outra análise fundamental é a avaliação das estruturas como acrossoma, membrana plasmática e mitocôndria, a traves de sondas fluorescentes, considerando que para que a fertilização aconteça o espermatozoide precisa destas estruturas íntegras e funcionais para realizar a capacitação, hiperactivação e reação acrossomal (AMANN, 1989; CELEGHINI et al., 2010).

Os resultados dos estudos com múltiplas análises e as correlações descritas na literatura são controversas e ainda não se conhece sobre a concordância entre as técnicas. Com base nestas dificuldades e na necessidade de melhorar o controle de qualidade de partidas de sêmen comercial por razões econômicas e da demanda crescente pelo uso na IATF, este trabalho tem por objetivo verificar se há complementariedade nas técnicas de análise de sêmen convencional com as técnicas mais objetivas, avaliação computadorizada da motilidade e estudo da integridade das membranas e função espermática sondas fluorescentes, para determinação de partidas de qualidade alta, boa e questionáveis.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Local

As análises do sêmen foram realizadas no Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos (LATES) e no laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia, ambos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, localizado no Campus Fernando Costa, Pirassununga, SP.

4.2.2 Partidas de sêmen

Foram recebidas 80 partidas de sêmen de dois touros da raça Angus (47 partidas do touro J e 33 do touro K). As partidas foram armazenadas em botijão de nitrogênio líquido até o momento das análises. Segundo as informações da central, baseados em 872 inseminações artificiais, sendo a média de taxa de prenhez (TP) para o touro J de 46% (863 inseminações) e do touro K de 33% (9 inseminações), esses touros foram considerados como de baixa fertilidade. Estas partidas de sêmen não foram para IATF portanto a TP das partidas avaliadas neste experimento ainda não foi determinada.

4.2.3 Avaliações convencionais do sêmen

Duas palhetas (0,25 mL) de sêmen de cada partida foram descongeladas a 37°C por 30 segundos em banho-Maria e o sêmen depositado em um microtubo de 1,5 mL. O sêmen foi mantido em banho-Maria seco (37°C) durante as análises. Todo material utilizado para as análises foi mantido na temperatura de 37°C com auxílio de mesa aquecedora e platina aquecedora. As análises imediatas foram a determinação de motilidade subjetiva total, avaliando a porcentagem de espermatozoides móveis no campo óptico (%). Para a determinação do vigor, foi classificado subjetivamente em escores de 1 a 5, sendo 1 referente ao movimento mais lento do espermatozoide e 5 a máxima movimentação retilínea e velocidade rápida dos espermatozoides, usando para estas análises um microscópio óptico de contraste de fase (Marca Nikon, Modelo E200), em aumento de 100 x. A concentração espermática foi avaliada por meio da diluição do sêmen em uma solução de formol salino tamponado 4%, na proporção de 1:100, sendo colocado 10 µL de sêmen em 990 µL de formol salino tamponado. Para a contagem foi usada câmara de Neubauer sob microscopia de contraste de fase (Marca Nikon, Modelo E200), em aumento de 400 x. Para morfologia espermática, uma alíquota de 50 µL de sêmen foi depositada em um microtubo e adicionado 5 µL de formol salino tamponado 4%, homogeneizado e armazenado a 5°C para leitura em até 24 horas. Foi usada a técnica de câmara úmida, colocando uma alíquota de 3 µL do sêmen diluído entre lâmina e lamínula para realizar a contagem de 200 células por amostra, sob microscopia de contraste de interferência diferencial (Modelo 80i, Nikon Tóquio, Japão) com aumento de 1.000 x. As porcentagens das diversas anormalidades morfológicas foram agrupadas e classificadas em defeitos maiores, defeitos menores e defeitos totais (BLOM, 1973).

4.2.4 Análise computadorizada do movimento espermático

A avaliação computadorizada da motilidade espermática (CASA) foi realizada pelo sistema computadorizado *Sperm Class Analyzer* (SCA[®], Microptic). Foram configuradas as características espermáticas ajustando o Setup para sêmen bovino (Apêndice A). A análise foi feita depositando 10 µL de sêmen diluído em meio TALP a 25×10^6 espermatozoides/mL em

uma câmara de leitura padrão (Makler, SEFI Medical Instrumentos LTD, Haifa Israel) previamente aquecida a 37°C. Os características de cinética espermática avaliados foram: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude lateral da cabeça (ALH, μm), frequência de batimento (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade (LIN, %), células com velocidade rápida (RAPID, %). Foram avaliados 5 campos, escolhendo os campos que não apresentavam artefatos.

4.2.5 Análise das membranas espermáticas por sondas fluorescentes

Para a avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial foi utilizada uma amostra de 150 μL de sêmen diluído em meio TALP a 25×10^6 espermatozoides/mL, sendo adicionadas as sondas fluorescentes: 2 μL de Hoescht 33342 (H342, 2,5 mg/mL, Molecular Probes), 3 μL de Iodeto de propídio (PI, 0,5 mg/mL, Sigma-Aldrich), 50 μL de aglutinina de *Pisum sativum* conjugada com Isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA, 100 $\mu\text{g/mL}$, Sigma-Aldrich) e 6 μL de iodeto de 5,5',6,6'tetracloro 1,1',3,3'tetraetilbenzimidazolil Carbocianina (JC-1, 153 μM , Sigma-Aldrich) preparadas conforme descrito por Celeghini et al. (2007). Após a adição das sondas fluorescentes, a amostra foi incubada por 8 minutos a 37°C. A leitura foi realizada sob microscopia de epifluorescência (Modelo 80i, Nikon Tóquio, Japão) em aumento de 1.000 x, utilizando-se o filtro triplo (D/F/R, C58420) apresentando os conjuntos UV-2E/C (excitação 340-380 nm e emissão 435-485 nm), B-2E/C (excitação 465-495 nm e emissão 515-555 nm) e G-2E/C (excitação 540-525 nm e emissão 605-655 nm).

Foram avaliadas 200 células por amostra, sendo classificadas de acordo com a fluorescência emitida por cada sonda em: PIAIA: membrana plasmática intacta, membrana acrossomal intacta e alto potencial de membrana mitocondrial, PIAIB: membrana plasmática intacta, membrana acrossomal intacta e baixo potencial de membrana mitocondrial, PIALA: membrana plasmática intacta, membrana acrossomal lesada e alto potencial de membrana mitocondrial, PIALB: membrana plasmática intacta, membrana acrossomal lesada e baixo potencial de membrana mitocondrial, PLAIA: membrana plasmática lesada, membrana acrossomal intacta e alto potencial de membrana mitocondrial, PLAIB: membrana plasmática lesada, membrana acrossomal intacta e baixo potencial de membrana mitocondrial, PLALA:

membrana plasmática lesada, membrana acrossomal lesada e alto potencial de membrana mitocondrial, PLALB: membrana plasmática lesada, membrana acrossomal lesada e baixo potencial de membrana mitocondrial. Foram consideradas nos resultados o percentual de células PIAIA, membrana plasmática íntegra (MPI), acrossoma íntegro (MAI) e alto potencial de membrana mitocondrial (APM).

4.2.6 Grupos de qualidade espermática

Foram separadas as partidas em três categorias: sêmen de alta qualidade (A), sêmen de boa qualidade (B) e sêmen de qualidade questionável (Q), de acordo com os resultados obtidos pela análise convencional, basicamente, foi usado o resultado da motilidade, vigor e alterações morfológicas. Cada característica foi dividida em classes e foram determinados pontos para cada classe (Quadro 2), assim quanto mais pontos, maior a qualidade do sêmen. Realizando a somatória dos pontos respectivos ao resultado de cada teste espermático surgiu uma nota final que definia o grupo ao qual a partida pertencia. O sêmen de alta qualidade (A) foram as partidas com nota >7 , o sêmen de boa qualidade (B) foram as partidas com nota entre 5 e 6 e sêmen de qualidade questionável (Q) foram as partidas com notas <4 . Nestes grupos foram observados os resultados das análises convencionais, PIAIA e CASA.

Quadro 2– Descrição dos pontos outorgados a cada característica espermático definido pela análise convencional.

	Classe Convencional	Pontos
Vigor (1-5)	$\leq 2,0$	0
	2,5-3,0	1
	3,5-4,0	2
	4,5 -5,0	3
Motilidade (%)	≤ 30	0
	30 - 44	1
	45 - 59	2
	60 - 74	3
	≥ 75	4
Defeitos morfológicos (%)	≥ 35	0
	34 - 29	1
	23 - 28	2
	17 - 22	3
	11 - 16	4

	≤ 10	5
--	-----------	---

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

4.2.7 Teste de Concordância

Foi realizada a concordância entre o resultado de qualidade espermática determinado por três métodos de análises de sêmen, sendo que cada método segue uma metodologia diferente para definir a qualidade do sêmen em sêmen de alta qualidade (A), sêmen de boa qualidade (B) e sêmen de qualidade questionável (Q). O método 1: foi pela análise convencional, método 2: pela análise da população de espermatozoides PIAIA, e método 3: avaliação computadorizada da motilidade. Das 80 partidas, foram utilizados os dados de 67 partidas para as análises de concordância. Devido a que 23 partidas de sêmen perderam a análise do CASA pelo alto conteúdo de partículas no sêmen que impossibilitou a contagem.

O método 1 para determinar a qualidade das partidas pela análise convencional usa a mesma distribuição por classes descrita no quadro 2. Determinando como partidas de alta qualidade (A) com nota >7 , boa qualidade (B) com nota entre 5 e 6 e de qualidade questionável (Q) com nota <4 .

A determinação da qualidade das partidas pelo método 2 considerou o resultado da porcentagem de células PIAIA. Os valores da porcentagem de células PIAIA foram organizados da menor para a maior, para posterior separação por quartis, de tal forma que aproximadamente 25% dos dados inferiores ou iguais ao quartil 1 são da categoria qualidade questionável (Q), aproximadamente 25% dos dados superiores ou iguais ao quartil 3 são a categoria de alta qualidade (A) e os dados restantes, aproximadamente 50%, situados entre os quartis 1 e 3 correspondem à categoria de boa qualidade (B). No quadro 4 estão os valores para a separação das partidas por quartis para PIAIA.

O método 3 separou as partidas por qualidade segundo a análise computadorizada da motilidade, considerando só os valores de MP, VCL, VSL, VAP, desconsiderando as outras características da motilidade. Cada característica foi organizada da menor para a maior e separada por quartis, considerando o quartil 1 como categoria Q, quartil 2 como categoria B e quartil 3 como categoria A (Quadro 3). Assim, tendo os 4 características classificados nas categorias A, B e Q. Com o resultado nos 4 características, foi a moda que determinou a categoria final de cada partida.

Quadro 3– Descrição dos valores obtidos dos quartis para as características espermáticas obtidas por sondas fluorescentes (PIAIA) e CASA (MP, VCL, VSL, VAP)

	Características espermáticas				
	Sondas fluorescentes	CASA			
	PIAIA ¹ (%)	MP ² (%)	VCL ³ (µm/s)	VSL ⁴ (µm/s)	VAP ⁵ (µm/s)
Mínimo	26	10,5	112,8	35,7	66,4
Quartil 1	<44,4	<46,5	<141,8	<65,5	<86,9
Quartil 2	44,5 -58,9	46,6-57,8	141,9-165,4	65,6-80,3	87,0-97,7
Quartil 3	>59,0	>57,9	>165,5	>80,4	>97,8
Máximo	75	66,5	185,5	137,2	107,5

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

¹PIAIA: membranas plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial de mitocôndria, ²MP: motilidade progressiva, ³VCL: velocidade curvilínea, ⁴VSL: velocidade progressiva, ⁵VAP: velocidade de trajeto.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi verificada a homogeneidade das variâncias pelo teste de Shapiro-Wilk dos dados obtidos pelas análises convencionais, sondas fluorescentes e CASA. Dados que não preencheram os pressupostos foram transformados. O efeito do grupo (Alta qualidade, Boa qualidade e Questionável) foi analisado o procedimento PROC MIXED o programa SAS (versão 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). Todas as variáveis estudadas em caso de efeitos significativos foi utilizado o Teste de Tukey como procedimento de comparações múltiplas. Foram consideradas diferenças significativas quando a probabilidade foi $\leq 0,05$ e como tendência quando a probabilidade foi $\leq 0,10$. Os resultados são apresentados com estimativas de médias e erros padrão

Os dados provenientes das técnicas de avaliação seminal foram submetidos à análise de correlação de Pearson adotando o valor de significância de $p \leq 0,05$ ou de tendência $p \leq 0,09$.

Para determinar a intensidade da concordância entre as três classes designadas como: classe convencional, classe PIAIA e classe CASA, foi utilizado o teste estatístico para avaliar a significância do Kappa, usando a ferramenta oferecida pelo Laboratório de Epidemiologia e Estatística (LEE) da Universidade de São Paulo (<http://www.lee.dante.br/kappa/GeraTabela>) a interpretação no Quadro 4. Neste caso a hipótese testada é se o Kappa é igual a 0, o que indicaria concordância nula, ou se ele é maior do que zero, concordância maior do que o acaso (teste monocaudal: $H_0: K = 0$; $H_1: K > 0$). Um Kappa com valor negativo, que não tem interpretação cabível, pode resultar num paradoxal nível crítico (valor de P) maior do que 1.

No caso de rejeição da hipótese, temos a indicação de que a medida de concordância é significativamente maior do que zero, o que indicaria que existe algum nível de concordância.

Quadro 4– Interpretação dos valores do Kappa

Valor do Kappa	Interpretação
<0	Sem concordância
0-0,19	Concordância pobre
0,20-0,39	Concordância razoável
0,40-0,59	Concordância moderada
0,60-0,79	Concordância substancial
0,80-1,00	Perfeita concordância

Fonte: Landis JR, Koch GG, 1977

4.4 RESULTADOS

A separação dos grupos em alta qualidade (A), boa qualidade (B) e qualidade questionável (Q) das 80 partidas resultou em partidas Q: 28,75%, B: 41,25% e A: 30%.

Quadro 5 – Descrição das notas e das categorias dadas a cada partida de sêmen segundo a alta qualidade (A), boa qualidade (B), qualidade questionável (Q)

Numero	Touro	Partida	Nota	Categoria
1	J	J-01	3	Q
2	J	J-02	3	Q
3	J	J-03	3	Q
4	J	J-04	3	Q
5	K	K-01	3	Q
6	K	K-02	3	Q
7	J	J-05	4	Q
8	J	J-06	4	Q
9	J	J-07	4	Q
10	J	J-08	4	Q
11	J	J-09	4	Q
12	J	J-10	4	Q
13	J	J-11	4	Q
14	J	J-12	4	Q
15	J	J-13	4	Q
16	J	J-14	4	Q
17	K	K-03	4	Q
18	K	K-04	4	Q
19	K	K-05	4	Q
20	K	K-06	4	Q
21	K	K-07	4	Q
22	K	K-08	4	Q

(Continuação)

Numero	Touro	Partida	Nota	Categoria
23	K	K-09	4	Q
24	J	J-15	5	B
25	J	J-16	5	B
26	J	J-17	5	B
27	J	J-18	5	B
28	J	J-19	5	B
29	J	J-20	5	B
30	K	K-10	5	B
31	K	K-11	5	B
32	K	K-12	5	B
33	K	K-13	5	B
34	K	K-14	5	B
35	K	K-15	5	B
36	K	K-16	5	B
37	K	K-17	5	B
38	K	K-18	5	B
39	K	K-19	5	B
40	J	J-21	6	B
41	J	J-22	6	B
42	J	J-23	6	B
43	J	J-24	6	B
44	J	J-25	6	B
45	J	J-26	6	B
46	J	J-27	6	B
47	J	J-28	6	B
48	J	J-29	6	B
49	J	J-30	6	B
50	J	J-31	6	B
51	J	J-32	6	B
52	K	K-20	6	B
53	K	K-21	6	B
54	K	K-22	6	B
55	K	K-23	6	B
56	K	K-24	6	B
57	J	J-33	7	A
58	J	J-34	7	A
59	J	J-35	7	A
60	J	J-36	7	A
61	J	J-37	7	A
62	J	J-38	7	A
63	J	J-39	7	A
64	J	J-40	7	A
65	K	K-25	7	A
66	K	K-26	7	A
67	K	K-27	7	A
68	K	K-28	7	A
69	K	K-29	7	A
70	K	K-30	7	A
71	K	K-31	7	A
72	J	J-41	8	A
73	J	J-42	8	A
74	J	J-43	8	A
75	J	J-44	8	A
76	J	J-45	8	A
77	J	J-46	8	A
78	K	K-32	8	A
79	K	K-33	8	A
80	J	J-47	10	A

Fonte: Florez-Rodriguez (2017).

4.4.1 Resultados da análise de variância entre categorias

O métodos para estabelecer os grupos considerando as análises convencionais foi eficiente para separar por qualidade as partidas A, B e Q. Evidenciou-se que a qualidade do sêmen A é superior ao B pelas diferenças no vigor, os defeitos maiores e totais ($P < 0,05$). O grupo de partidas Q tem menor qualidade que o B, quando observado o comportamento para defeitos espermáticos maiores e totais, sendo menor para o sêmen B em comparação ao grupo Q. Quando foi considerado o número de espermatozoides móveis por palheta, os grupos Q e B foram semelhantes, mas ambos foram inferiores ao grupo A.

Tabela 1 – Médias ($\pm$ Erro padrão) das características espermáticas avaliadas de forma convencional de acordo com as três categorias: qualidade questionável (Q), boa qualidade (B) e alta qualidade (A)

Características espermáticas	Qualidade pela análise convencional		
	Q	B	A
Mot Sub ¹ (%)	51,90 $\pm$ 8,6 ^b	53,90 $\pm$ 6,7 ^{ab}	62,79 $\pm$ 5,83 ^a
Vigor (1-5)	2,35 $\pm$ 0,08 ^c	2,58 $\pm$ 0,07 ^b	2,92 $\pm$ 0,08 ^a
N. espermatozoides móveis/palheta ² ($\times 10^6$)	12,14 $\pm$ 0,76 ^b	12,82 $\pm$ 0,64 ^b	15,71 $\pm$ 0,75 ^a
DME ³ (%)	5,24 $\pm$ 1,22 ^a	4,25 $\pm$ 1,19 ^{ab}	3,11 $\pm$ 1,19 ^b
DMA ⁴ (%)	26,96 $\pm$ 1,03 ^a	18,68 $\pm$ 0,86 ^b	15,17 $\pm$ 1,01 ^c
DT ⁵ (%)	31,83 $\pm$ 1,81 ^a	22,6 $\pm$ 1,69 ^b	18,03 $\pm$ 1,73 ^c

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

Legenda:¹Mot Sub: Motilidade total subjetiva, ²N. espermatozoides móveis/palheta: Número de espermatozoides móveis por palheta, ³DME: Defeitos menores, ⁴DMA: Defeitos maiores, ⁵DT: Defeitos totais.

^{ab} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$) no teste de Tukey.

A tabela 2 apresenta os resultados da avaliação computadorizada da motilidade obtidos em cada grupo de qualidade. A única característica do movimento espermático que apresentou diferença significativa entre os grupos A, B e Q foi a MT. O grupo que foi determinado como A pela análise convencional também apresentou motilidade superior em comparação aos grupos B e Q ($p < 0,05$), mas pelo CASA não foram detectadas diferenças entre o grupo B e Q ($p > 0,05$).

Tabela 2 – Médias ($\pm$ Erro padrão) das características espermáticas avaliadas pelo CASA nas três categorias de qualidade seminal determinadas pelo análise convencional: questionável (Q), boa qualidade (B) e alta qualidade (A)

Características espermáticas	Qualidade pela análise convencional		
	Q	B	A
MT ¹ (%)	63,29 $\pm$ 2,35 ^b	64,06 $\pm$ 2,03 ^b	71,23 $\pm$ 2,20 ^a
MP ² (%)	51,33 $\pm$ 3,59	49,92 $\pm$ 3,22	52,59 $\pm$ 3,29
RAP ³ (%)	70,89 $\pm$ 2,63	68,48 $\pm$ 2,21	73,38 $\pm$ 2,38
VCL ⁴ (μ m/s)	148,37 $\pm$ 5,06	153,24 $\pm$ 4,52	153,94 $\pm$ 4,46
VSL ⁵ (μ m/s)	71,58 $\pm$ 3,51	73,76 $\pm$ 2,87	68,95 $\pm$ 3,18
VAP ⁶ (μ m/s)	91,20 $\pm$ 2,23	92,70 $\pm$ 1,82	90,59 $\pm$ 2,02
LIN ⁷ (%)	49,45 $\pm$ 2,78	47,55 $\pm$ 2,63	46,00 $\pm$ 2,63
STR ⁸ (%)	79,04 $\pm$ 2,82	77,67 $\pm$ 2,62	77,26 $\pm$ 2,63
ALH ⁹ (μ m)	3,08 $\pm$ 0,16	3,14 $\pm$ 0,15	3,17 $\pm$ 0,15
BCF ¹⁰ (Hz)	21,47 $\pm$ 0,73	21,35 $\pm$ 0,66	21,78 $\pm$ 0,68

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

Legenda: ¹MT: Motilidade total, ²MP: Motilidade progressiva, ³RAP: Células rápidas, ⁴VCL: Velocidade curvilínea, ⁵VSL: Velocidade progressiva, ⁶VAP: Velocidade do trajeto, ⁷LIN: Linearidade, ⁸STR: Retilinearidade, ⁹ALH: Deslocamento lateral da cabeça, ¹⁰BCF: Frequência de batimentos.

^{ab} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$) no teste de Tukey.

A MPI e APM foram superiores quando a qualidade de sêmen avaliado pelos testes convencionais era de alta qualidade ($P < 0,05$). A população de espermatozoides PIAIA foi maior no grupo A do que nos grupos B e Q. A integridade do acrossoma não diferiu entre os grupos A e B, mas o grupo A apresentou maior MAI que o grupo Q ($P > 0,05$). O grupo Q mostrou menor potencial de membrana mitocondrial, menor integridade de membrana plasmática e maior porcentagem de PLALS do que os grupos B e A (Tabela 3).

Tabela 3 – Médias ($\pm$ Erro padrão) da avaliação por sondas fluorescentes das três categorias de qualidade seminal determinadas pelo análise convencional: alta qualidade: questionável (Q), boa qualidade (B) e alta qualidade (A)

Características espermáticas	Qualidade pela análise convencional		
	Q	B	A
PIAIA ¹ (%)	45,82 $\pm$ 2,72 ^b	49,83 $\pm$ 2,39 ^b	55,62 $\pm$ 2,62 ^a
PLALS ² (%)	22,39 $\pm$ 2,59 ^a	15,93 $\pm$ 2,37 ^b	11,29 $\pm$ 2,48 ^c
MPI ³ (%)	52,70 $\pm$ 2,57 ^c	59,76 $\pm$ 2,15 ^b	66,44 $\pm$ 2,52 ^a
MAI ⁴ (%)	71,58 $\pm$ 1,81 ^b	74,22 $\pm$ 1,59 ^{ab}	77,87 $\pm$ 1,74 ^a
APM ⁵ (%)	53,20 $\pm$ 3,86 ^c	59,44 $\pm$ 3,59 ^b	65,94 $\pm$ 3,69 ^a

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

Legenda: ¹PIAIA: Membranas plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial de mitocôndria ²PLALS: Membranas plasmática e acrossomal lesadas e baixo potencial de mitocôndria, ³MPI: Membrana plasmática íntegra, ⁴MAI: Membrana acrossomal íntegra, ⁵APM: Alto potencial mitocondrial.

^{ab} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$) no teste de Tukey.

4.4.2 Resultados da correlação entre características espermáticas

Os valores de correlação entre as características espermáticas obtidas pelas análises convencional e objetiva são mostrados nas Tabelas 4, 5 e 6. Em geral, não foi possível encontrar boas correlações entre as características espermáticas verificadas entre as análises convencional e por sondas fluorescentes. Houve correlação positiva ($r= 0,43$) entre N. espermatozoides móveis/palheta e motilidade subjetiva ($P=0,0002$), também entre N. espermatozoides móveis/palheta e MPI ($r= 0,26$; $P=0,02$) e correlação negativa entre N. espermatozoides móveis/palheta e porcentagem de células PLALS ($r= -0,26$; $P=0,03$). Alguma tendência de significância para correlação positiva entre N. espermatozoides móveis/palheta com defeitos totais ($r= 0,21$; $P= 0,07$) e também entre N. espermatozoides móveis/palheta com PIAIA houve correlação positiva ($r= 0,22$; $P=0,06$) assim como com TPM ($r= 0,20$; $P=0,09$).

Tabela 4 – Correlações de Pearson entre as características espermáticas obtidas pela análise convencional e pela análise por CASA e sondas fluorescentes

	Mot Sub ¹	Vigor	N. sperm. m/p ²	DMA ³	DT ⁴	PIAIA ⁵	PLALS ⁶	MPI ⁷	MAI ⁸	APM ⁹
Mot Sub¹	1,00	0,62	0,43 ^a	0,003	-0,01	0,21	-0,22	0,16	0,30	0,18
N. sperm. m/p²			1,00	-0,19	-0,21 ^c	0,22 ^c	-0,26 ^b	0,26 ^b	0,12	0,20 ^c
DMA³				1,00	0,94 ^a	0,15	0,29	-0,28	-0,02	-0,25

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

Legenda: ¹Mot Sub: Motilidade total subjetiva, ²N. sperm. m/p: Número de espermatozoides móveis por palheta, ³DMA: Defeitos maiores, ⁴DT: Defeitos totais, ⁵PIAIA: membranas plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial de mitocôndria, ⁶PLALS: membranas plasmática e acrossomal lesadas e baixo potencial de mitocôndria, ⁷MPI: membrana plasmática íntegra, ⁸MAI: Membrana acrossomal íntegra, ⁹APM: Alto potencial mitocondrial.

^a $P \leq 0,001$, ^b $P \leq 0,05$, ^c $P \leq 0,09$

Quando os dados do CASA foram observados (Tabela 5), houve uma baixa correlação entre N. espermatozoides móveis/palheta e STR ($r=0,14$; $P=0,05$). Dentro das características do CASA, várias características espermáticas (MT e RAP, VAP e VCL, VAP e VSL, LIN e MP, MP e STR, STR e VSL, STR e LIN, ALH e VCL, BCF e MP, BCF e STR) foram altamente correlacionadas ($P < 0,01$). Dentro das variáveis correlacionadas na tabela 6, não houve significância estatística entre as características avaliadas por sondas e as avaliações computadorizadas da motilidade.

Tabela 5 – Correlações de Pearson entre as características espermáticas obtidas pela análise convencional e pela análise computadorizada da motilidade

	MT	MP	RAP	VCL	VSL	VAP	LIN	STR	ALH ¹¹	BCF ¹²
Mot Sub¹	0,23	0,27	0,26	0,20	0,16	0,21	0,16	0,22	0,15	0,28
Vigor	0,09	-0,07	0,12	0,20	0,16	0,21	0,16	0,22	0,15	-0,01
N. sperm. m/p²	-0,17	0,11	-0,11	0,06	0,08	0,02	0,06	0,14 ^b	0,09	0,13
MT³	1,00	0,47	0,84 ^a	0,05	0,05	0,17	0,11	0,06	-0,01	0,36
MP⁴		1,00	0,55	0,47	0,72	0,77	0,80 ^a	0,87 ^a	0,14	0,90 ^a
RAP⁵			1,00	0,19	0,21	0,32	0,23	0,22	0,04	0,49
VCL⁶				1,00	0,59	0,82 ^a	0,17	0,48	0,85 ^a	0,53
VSL⁷					1,00	0,82 ^a	0,72	0,81 ^a	0,29	0,75
VAP⁸						1,00	0,65	0,80	0,51	0,78
LIN⁹							1,00	0,91 ^a	-0,14	0,77
STR¹⁰								1,00	0,18	0,88 ^a

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

Legenda: ¹Mot Sub: Motilidade total subjetiva, ²N. sperm. m/p: Número de espermatozoides móveis por palheta, ³MT: Motilidade total, ⁴MP: Motilidade progressiva, ⁵RAP: espermatozoides rápidos, ⁶VCL: Velocidade curvilínea, ⁷VSL: Velocidade progressiva, ⁸VAP: Velocidade do trajeto, ⁹LIN: Linearidade, ¹⁰STR: Retilinearidade, ¹¹ALH: Deslocamento lateral da cabeça, ¹²BCF: Frequência de batimentos.

^aP≤0,001, ^bP≤0,05, ^cP≤0,09

Tabela 6 – Correlação de Pearson entre as características espermáticas obtidas pela análise por sondas fluorescentes e pela análise computadorizada da motilidade

	MT ¹	MP ²	RAP ³	VCL ⁴	VSL ⁵	VAP ⁶	LIN ⁷	STR ⁸	ALH ⁹	BCF ¹⁰
PIAIA¹¹	0,26	0,24	0,27	0,15	0,09	0,16	0,09	0,10	0,11	0,13
PLALS¹²	-0,11	-0,06	-0,13	-0,01	0,09	0,04	0,09	0,08	0,05	0,05
MPI¹³	0,19	0,16	0,17	0,02	-0,03	0,03	0,02	0,02	-0,05	0,04
MAI¹⁴	0,27	0,21	0,33	0,04	0,04	0,04	0,05	0,06	0,0007	0,12
APM¹⁵	0,16	0,04	0,17	0,13	-0,05	0,03	-0,13	-0,10	0,10	-0,07

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

Legenda: ¹MT: Motilidade total, ²MP: Motilidade progressiva, ³RAP: células rápidas, ⁴VCL: Velocidade curvilínea, ⁵VSL: Velocidade progressiva, ⁶VAP: Velocidade do trajeto, ⁷LIN: Linearidade, ⁸STR: Retilinearidade, ⁹ALH: Deslocamento lateral da cabeça, ¹⁰BCF: Frequência de batimentos da cauda. ¹¹PIAIA: membranas plasmática e acrossomal intactas e alto potencial de mitocôndria, ¹²PLALS: Membranas plasmática e acrossomal lesadas e baixo potencial de mitocôndria ¹³MPI: Membrana plasmática íntegra, ¹⁴MAI: Membrana acrossomal íntegra, ¹⁵APM: Alto potencial mitocondrial.

4.4.3 Resultados da distribuição das partidas por modelos de avaliação

Foram utilizadas 67 partidas com os dados completos da avaliação do CASA. Os resultados da determinação da qualidade de uma partida pelos três métodos estão descritos no quadro 6.

Quadro 6 – Determinação da qualidade das partidas em Alta qualidade (A), Boa qualidade (B) e Questionável (Q) pelos três métodos utilizados: análise convencional, PIAIA e CASA

Touro	Partida	Nota Conv.	Categoria Convencional	PIAIA ¹ (%)	Categoria PIAIA	MP ² (%)	VCL ³ (µm/s)	VSL ⁴ (µm/s)	VAP ⁵ (µm/s)	Categoria CASA
K	K-20	6	B	26,0	Q	47,1	134,1	64	81,1	Q
J	J-01	3	Q	28,0	Q	31,1	135,3	45,9	75,5	Q
K	K-03	4	Q	29,0	Q	50,7	145,2	65,8	84,1	B
K	K-10	5	B	31,0	Q	44,9	158,4	75	94,3	B
K	K-25	7	A	32,5	Q	58,1	154,2	75,2	94,7	B
K	K-11	5	B	33,0	Q	52,1	153	77,1	96,3	B
J	J-21	6	B	33,5	Q	10,5	121,1	35,7	66,4	Q
J	J-22	6	B	34,5	Q	46,7	174,4	75,5	100	A
K	K-04	4	Q	39,5	Q	49,7	137,5	75,9	90,9	B
J	J-02	3	Q	41,5	Q	23,8	124,1	39,4	69,7	Q
J	J-05	4	Q	42,5	Q	53,7	171	76,3	98,6	A
K	K-12	5	B	42,5	Q	49	146,7	69,2	88,6	B
J	J-07	4	Q	43,5	Q	53	163,1	83,4	100,2	A
K	K-26	7	A	44,5	B	58,9	160,3	77,4	97,1	B
K	K-05	4	Q	45,0	B	53,8	140	76,9	91,4	B
J	J-15	5	B	45,5	B	30,3	126,1	45,3	74,2	Q
K	K-01	3	Q	46,0	B	40,6	131,8	53,8	80	Q
K	K-13	5	B	46,0	B	54	163,7	77,5	99	A
J	J-16	5	B	47,0	B	52,9	157,9	137,2	96,2	B
K	K-06	4	Q	47,5	B	49,1	148,6	74,2	93,4	B
J	J-23	6	B	47,5	B	57,3	175,1	84,6	104,7	A
J	J-08	4	Q	48,0	B	62,1	149,7	68,7	88,2	B
K	K-27	7	A	48,0	B	54,5	146,5	80,8	96,2	B
K	K-28	7	A	48,0	B	62,2	167	81,9	101,1	A
K	K-14	5	B	49,5	B	52	151,1	70,7	90,7	B
J	J-17	5	B	50,5	B	62,9	164,8	82,9	103,4	A
K	K-32	8	A	50,5	B	47	155,1	73,4	89,7	B
J	J-09	4	Q	51,0	B	38,1	153,4	58,7	83	Q
J	J-33	7	A	51,5	B	44,2	160,8	67,1	91,7	B
J	J-34	7	A	52,0	B	53	174,8	85,1	101,7	A
J	J-35	7	A	52,5	B	58	165,2	65,7	87,6	B
J	J-10	4	Q	53,0	B	66,5	146,9	72,2	90,6	B
K	K-07	4	Q	53,0	B	46,2	165,5	74	93,2	B
K	K-29	7	A	54,0	B	58,3	154,3	65,3	86,9	B
K	K-15	5	B	54,3	B	55,6	167,5	82	102,6	A
K	K-22	6	B	54,5	B	52,3	157,9	72,4	92,1	B
K	K-16	5	B	55,5	B	49,2	152,2	65,2	90,5	B
J	J-41	8	A	55,5	B	38,4	137,5	53,6	81,5	Q
J	J-24	6	B	56,5	B	64,4	173,6	84	105,2	A
J	J-25	6	B	56,5	B	53,5	166,4	81,5	100,8	A
K	K-02	3	Q	57,0	B	52,7	171,1	82,1	103,7	A
J	J-26	6	B	57,0	B	52	132,1	62,5	85,2	Q
J	J-27	6	B	57,0	B	13,1	126,7	36,2	66,6	Q
J	J-28	6	B	57,5	B	49,5	160,4	75,7	95,6	B
K	K-30	7	A	58,0	B	37,9	112,8	46,8	72,8	Q
K	K-33	8	A	58,0	B	63,8	133,2	78,1	93,3	B
J	J-42	8	A	58,0	B	55,7	150,9	75,2	90,8	B
J	J-36	7	A	58,3	B	46,8	165,5	71,7	94,3	B
K	K-17	5	B	59,0	A	45,4	154,8	71	89,9	B
J	J-43	8	A	59,0	A	44	175,9	69,6	95,2	B
J	J-44	8	A	59,0	A	50,2	180,3	73,8	98,5	A
J	J-03	3	Q	60,0	A	57,1	152,7	82,3	95,2	B
J	J-29	6	B	60,5	A	52,5	183,5	82,7	103,6	A

(Continuação)

Touro	Partida	Nota	Categoria Convencional	PIAIA ¹ (%)	Categoria PIAIA	MP ² (%)	VCL ³ (µm/s)	VSL ⁴ (µm/s)	VAP ⁵ (µm/s)	Categoria CASA
J	J-37	7	A	60,5	A	59,4	173,5	76,2	99,4	A
J	J-38	7	A	61,0	A	37	149,4	59,5	81,2	Q
K	K-18	5	B	63,0	A	65,7	140,9	82,1	94,8	A
J	J-11	4	Q	63,5	A	60	172,1	87,6	107,5	A
K	K-31	7	A	64,0	A	52	146,5	67,4	86,6	B
K	K-08	4	Q	66,0	A	57,8	142,7	80	96	B
K	K-19	5	B	66,2	A	65,2	137,4	83,7	95,6	A
J	J-45	8	A	68,0	A	46,4	140,9	57,3	83,7	Q
J	J-18	5	B	68,5	A	61	185,5	85,3	105,6	A
J	J-47	10	A	68,5	A	33,1	139,6	51,1	81,2	Q
J	J-30	6	B	72,5	A	61,1	146,6	70,8	90,5	B
J	J-39	7	A	75,0	A	54,1	162,3	65,2	86,9	B

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

Legenda: ¹PIAIA: membranas plasmática e acrossomal íntegras e alto potencial de mitocôndria, ²MP: motilidade progressiva, ³VCL: velocidade curvilinear, ⁴VSL: velocidade progressiva, ⁵VAP: velocidade de trajeto.

4.4.4 Resultados do teste de concordância

A tabela 7 descreve resumidamente os resultados em porcentagens da determinação da qualidade das partidas pelos três métodos.

Tabela 7 – Distribuição das partidas de sêmen bovino nas classes convencional, PIAIA e CASA de acordo com as categorias Alta qualidade (A), Boa qualidade (B) e Questionável (Q)

Categoria	Classe Convencional	Classe PIAIA	Classe CASA
A	22 (32,83%)	17 (25,37%)	19 (28,35%)
B	27 (48,29%)	33 (49,25%)	34 (50,74%)
Q	18 (26,86%)	17 (25,37%)	14 (20,89%)
TOTAL	67	67	67

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

As análises de concordância foram realizadas entre os três métodos de avaliação seminal: análise convencional, análise da porcentagem de PIAIA e análise computadorizada da motilidade (CASA). Na Tabela 8 se encontra o resultado da concordância geral, o valor de Kappa foi 0,05; considerando que a concordância perfeita é a de 1,00, nestes dados não há concordância ($p=0,328$).

Tabela 8 – Resultados do Kappa geral para a concordância entre as três classes convencional, PIAIA e CASA

Kappa geral	0,05*
P-valor geral	0,328
Intervalo de confiança 95%	Superior: 0,149 Inferior: -0,05

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

* P<0,05

Observando por separado cada uma das classes, foi encontrada uma concordância baixa (0,136) para determinar o grupo de partidas Q ($p = 0,053$) (Tabela 9).

Tabela 9 – Resultados dos Kappa para a concordância entre as três classes convencional, PIAIA e CASA, de acordo com as categorias Alta qualidade (A), Boa qualidade (B) e Questionável (Q)

	Categorias Convencional, PIAIA e CASA		
	A	B	Q
Kappa da categoria	0,055	-0,019	0,136
P-valor	0,437	-	0,053*
Intervalo de confiança 95%	Superior: 0,193 Inferior: -0,083	Superior: 0,119 Inferior: -0,157	Superior: 0,275 Inferior: -0,002

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

* P<0,05

Das 22 partidas classificadas como A na classe convencional só houve uma coincidência de 8 partidas classificadas como A pela análise de sondas. Das 27 partidas classificadas como B pela classe convencional só houve uma concordância com 15 e das 18 partidas consideradas como Q pela classe convencional só houve 7 coincidências. Existe uma baixa concordância ($Kappa = 0,265$, $p = 0,028$) entre a análise convencional e a análise por sondas fluorescentes para classificar as partidas questionáveis (Tabelas 10 e 11).

Tabela 10 – Resultados do Kappa geral para a concordância entre as classe convencional e classe PIAIA
Resultados do Kappa geral para a concordância entre as classe convencional e classe PIAIA

Kappa geral	0,143
P-valor geral	0,096
Intervalo de confiança 95%	Superior: 0,31 Inferior: -0,025

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

* P<0,05

Tabela 11 – Resultados dos Kappa para a concordância entre as classes convencional e PIAIA de acordo com as categorias Alta qualidade (A), Boa qualidade (B) e Questionável (Q)

	Categorias		
	A	B	Q
Kappa da categoria	0,174	0,029	0,265
P-valor	0,148	0,806	0,028*
Intervalo de confiança	Superior: 0,409	Superior: 0,26	Superior: 0,501
95%	Inferior: -0,062	Inferior: -0,202	Inferior: 0,028

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

* P<0,05

Os valores negativos para a concordância entre as análises convencional e CASA determinaram que a qualidade de uma partida pelas características da motilidade do CASA difere da qualidade avaliada pelos testes convencionais (Tabela 12 e 13).

Tabela 12 – Resultado do Kappa geral para a concordância entre as classes convencional e CASA

Kappa geral	-0,105
P-valor geral	n
Intervalo de confiança 95%	Superior: 0,065 Inferior: -0,275

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

n: Não é interpretável e não se aplica teste de significância.

Tabela 13 – Resultado do Kappa para a concordância entre as classes convencional e CASA de acordo com as categorias Alta qualidade (A), Boa qualidade (B) e Questionável (Q)

	Categorias		
	A	B	Q
Kappa da categoria	-0,157	-0,138	-0,002
P-valor	n	n	n
Intervalo de confiança	Superior: 0,081	Superior: 0,098	Superior: 0,235
95%	Inferior: -0,395	Inferior: -0,373	Inferior: -0,24

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

n: Não é interpretável e não se aplica teste de significância, IC: Intervalo de confiança da categoria.

Nas Tabelas 14 e 15 está apresentada a concordância entre as análises PIAIA e CASA. A determinação da qualidade espermática por estas técnicas difere nos resultados para definir a alta qualidade, boa e questionável.

Tabela 14 – Resultados do Kappa geral para a concordância entre as classes PIAIA e CASA

Kappa geral	0,104
P-valor geral	0,237
Intervalo de confiança 95%	Superior: 0,278 Inferior: -0,069

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

Tabela 15 – Resultados dos Kappa para a concordância entre as classes PIAIA e CASA de acordo com as categorias Alta qualidade (A), Boa qualidade (B) e Questionável (Q)

	Categoria		
	A	B	Q
Kappa da categoria	0,165	0,076	0,076
P-valor	0,175	0,534	0,533
Intervalo de confiança 95%	Superior: 0,404 Inferior: -0,073	Superior: 0,314 Inferior: -0,163	Superior: 0,315 Inferior: -0,163

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

4.5 DISCUSSÃO

O objetivo da análise do sêmen é determinar o potencial de fertilidade da amostra de sêmen (seja *in natura*, refrigerada ou congelada) usando procedimentos rápidos, simples e de baixo custo (MOCÉ; GRAHAM, 2008). Porém o impacto na fertilidade é o que deve definir se somente com os métodos convencionais, que são rápidos e econômicos, é possível atingir o objetivo. A qualidade do sêmen avaliada pelos resultados das análises convencionais, seguindo as sugestões descritas no manual do CBRA determinou que as partidas de sêmen tem bom potencial de fertilidade. A pesar que a taxa de prenhez desses touros da resultados baixos pela IATF (TP%: 33 e 46%). Portanto, possivelmente há influência de outras características espermáticas ou de fatores relacionados com a fêmea e fatores externos de protocolos, manejo, inseminação e ambiente, como relatado por Oliveira et al. (OLIVEIRA et al., 2012).

Para contornar as limitações da análise convencional na determinação do potencial de fertilidade existem as análises objetivas, que reforçam a análise convencional. Neste experimento notou-se que as partidas de alta qualidade pela avaliação convencional, também obtiveram valores altos para a MT% avaliada pelo sistema CASA, embora as outras

características do CASA não diferiram se o sêmen era de alta, boa ou qualidade questionável. Assim, a avaliação da MT% foi a única característica do CASA que conseguiu diferenciar o grupo de alta qualidade espermática. Apesar de que o CASA é muito utilizado na análise de sêmen, ainda não se conhece a real importância de cada característica da motilidade e quais são as características que indiquem a melhor qualidade do sêmen. Apesar de que foi relatado que o VSL é altamente correlacionado com fertilidade, devido a que reflete um papel fundamental no transporte espermático e migração através do muco durante o percurso até a tuba uterina (GILLAN et al., 2008). Também, as análises do CASA apresentaram baixa correlação com a avaliação subjetiva da motilidade, e nenhuma correlação com avaliação da morfologia espermática. Diferindo de Gillan et al. (2008) que relata que as características da motilidade avaliadas pelo CASA tem relação com defeitos morfológicos e que os espermatozoides tem maior VSL quando apresentam menos defeitos morfológicos. O fato das correlações serem baixas indica que elas devem ser usadas em conjunto, pois todas as características outorgam a capacidade ao espermatozoide de realizar a fecundação e a falha de qualquer uma dessas características tem reflexo na capacidade de fertilização.

O sêmen considerado de alta qualidade nas avaliações convencionais, apresentou alta qualidade quando avaliado pelas análises de sondas fluorescentes ($p < 0,05$). Portanto, através da análise de sondas fluorescentes por microscopia de epifluorescência se conseguiu determinar a alta qualidade de partidas de sêmen bovino. Mostrando que estas partidas possuem a maior população de espermatozoides PIAIA, com maior porcentagem de membranas intatas e com alto potencial de membrana mitocondrial. Existem correlações baixas entre a população de espermatozoides PIAIA e a motilidade subjetiva. O potencial de membrana mitocondrial usando o JC-1 teve baixa correlação com a avaliação da motilidade tanto subjetiva como pelo CASA e nenhuma correlação com as características de qualidade e velocidade do movimento. Indicando que a energia ou produção de ATP pela mitocôndria espermática não é o mecanismo principal para ativar a motilidade espermática.

As partidas de alta qualidade classificadas pelas sondas fluorescentes foram aquelas com $>59,0\%$ de espermatozoides PIAIA, as de boa qualidade entre $44,5\text{-}58,9\%$ e as de baixa qualidade $<44,4\%$. Um estudo prévio de Oliveira et al. (2014) utilizando a mesma técnica simultânea de avaliação da membrana plasmática, acrossomal e potencial mitocondrial por sondas fluorescentes descrita por Celeghini et al. (2007) notaram que a diminuição da porcentagem da população de espermatozoide PIAIA causa redução na taxa de fertilidade em bovinos, mesmo que a partida se encontre dentro das condições mínimas desejadas para comercialização e uso na IA pelas análises convencionais.

Não houve correlação entre as análises convencionais e análises por sondas fluorescentes exceto para concentração de espermatozoides móveis por palheta, que apresentou correlação positiva com PIAIA, PLALS, MPI e APM, apesar de que a concentração não foi considerada para separar as partidas entre alta, boa e qualidade questionável. A falta de correlação entre os métodos de avaliação seminal é devido a que os testes avaliam alteração ou da função ou da estrutura de organelas espermática específicas e que na avaliação imediata pós descongelação os eventos não estão exercendo influencia entre se. Isto indica que nenhum teste pode substituir o outro na avaliação do potencial de fertilidade.

Houve divergência no teste de concordância quando as partidas com maiores valores de populações PIAIA foram identificadas com qualidade diferente daquelas definidas pelas análises convencional e CASA. Observando por separado cada uma das categorias, houve discordância entre a análise convencional, a análise por sondas e a análise por CASA para determinar as partidas que tem alta qualidade e boa qualidade. No entanto, houve concordância ($p = 0,053$) entre as técnicas para determinar as partidas consideradas como questionáveis ($Kappa = 0,136$). Considerando que a concordância perfeita é a de 1,00; nestes dados, apesar de significativa a concordância é baixa. Igualmente, quando comparados os resultados do convencional e sondas, o resultado da concordância para a categoria de questionáveis foi de $\kappa = 0,265$ ($p = 0,028$). Pelo contrário, quando realizada a separação dos mais altos valores do CASA, estes valores não tiveram concordância com a avaliação feita pela análise convencional e pela análise por sondas, além disso, os espermatozoides não apresentaram variações entre as características de motilidade avaliados pelo sistema CASA.

As partidas utilizadas neste experimento são partidas de sêmen comercial, aptas para a comercialização e uso na IA de acordo com o Manual do CBRA (CBRA, 2013), no entanto, 26,86% das partidas resultaram questionáveis segundo a avaliação convencional, 20,89% foram questionáveis pela avaliação do CASA e 20,89% pela avaliação de sondas fluorescentes. Se eliminamos as 14 partidas questionáveis pela análise por sondas e outras 10 partidas consideradas questionáveis pelo CASA e eliminando 9 questionáveis pelo método convencional, no final teríamos 34 partidas para uso na IATF o que seria um 50,74% do total de partidas. Portanto, é possível que a seleção de partidas de qualidade superior poderia refletir na média da taxa de prenhez encontrada nestes touros. Estes resultados também evidenciam a complexidade do processo de fecundação, para o qual o espermatozoide deve ativar diversas funções metabólicas com o objetivo de alcançar o oócito e fecundar (WATSON, 2000).

Os resultados destacam a importância das análises convencionais, estas, quando bem conduzidas, são de grande valor, somado ao fato de serem simples e de pouco investimento e é mantida como padrão pela maioria das centrais e laboratórios de sêmen. Esta panorâmica permite reforçar a necessidade de uniformização dos métodos usados para cada teste e da capacitação entre os técnicos que avaliam o sêmen para diminuir os erros e a subjetividade (GILLAN et al., 2008). Portanto, as análises convencionais são necessárias, mas os resultados sobre o potencial de fertilidade serão mais precisos quando associadas a testes de avaliação computadorizada da motilidade e análises da integridade das membranas plasmática, acrossomal e potencial de membrana mitocondrial.

4.6 CONCLUSÕES

- A qualidade espermática determinada pela análise convencional difere da qualidade determinada pelas análises da porcentagem de espermatozoides PIAIA e da avaliação pelo CASA.
- Nenhum método de avaliação pode substituir o outro, pelo contrário eles se complementam.
- O controle de qualidade deve associar as técnicas de avaliação espermática convencionais, porcentagem de espermatozoides PIAIA e características da motilidade pelo CASA, assim, aumenta a oportunidade de algum teste detectar quando a qualidade de uma partida é questionável.

5 ARTIGO 2. INFLUÊNCIA DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO DO ESPERMATOZOIDE SOBRE OS ÍNDICES DE FERTILIDADE *IN VIVO*

5.1 INTRODUÇÃO

O espermatozoide fértil é aquele que possui um conjunto de características funcionais e estruturais que concedem-lhe habilidades para fecundar e participar do desenvolvimento embrionário. Algumas destas características já foram bem estudadas, e são mínimo 10 fatores seminais os que foram relatados como causadores de infertilidade (AMANN, 1989). Mas a complexidade das características espermáticas no ambiente uterino não foram bem compreendidas, por tanto, ainda é muito difícil prever a fertilidade de partidas de sêmen usadas em inseminação artificial (IA) através das técnicas laboratoriais de análise seminal.

Para que a fecundação aconteça o espermatozoide deve ser capaz de ativar os mecanismos fisiológicos de hiperativação, capacitação, reação acrossomal e fusão ao oócito, (FLESCHE; GADELLA, 2000; AITKEN, 2011). Por isto, a avaliação do potencial de fertilidade tem focado na avaliação de alguns fatores chave, como são a motilidade, integridade de membrana plasmática, acrossomal, potencial energético, oxidação celular e danos ao DNA, devido a que a alteração em mínimo alguma dessas características diminui o potencial de fertilidade (SELLEM et al., 2015). O potencial de fertilidade de um ejaculado não é determinado por apenas uma característica espermática, pelo contrário, precisa de mais avaliações feitas simultaneamente, além que, os resultados de várias avaliações laboratoriais devem ser combinados estatisticamente para procurar o efeito global de vários parâmetros independentes no espermatozoide (JANUŠKAUSKAS; ŽILINSKAS, 2002). As análises convencionais medem apenas um ou algumas destas características e devem ser complementados com testes funcionais (AMANN, 1989; GILLAN et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2012; SELLEM et al., 2015). Porém, ainda certos mecanismos responsáveis pelas funções críticas de fecundação são desconhecidos (GRANT et al., 2015).

A pesar que o fator principal de infertilidade é o DNA em sêmen humano (LEWIS et al., 2013). Para sêmen de bovinos ainda é controverso. O índice de fragmentação de DNA foi menor em touros de alta ($3,10 \pm 0,16\%$) do que de baixa fertilidade ($4,04 \pm 0,15$) ($P < 0,01$)

(GLIOZZI et al., 2017), mas as taxas de DFI% reportadas para sêmen congelado de bovinos são baixas ($6,1 \pm 3,1\%$) (WATERHOUSE et al., 2006), confirmando a baixa vulnerabilidade do DNA aos danos pelo processo de congelação e descongelação (GLIOZZI et al., 2017). Por outro lado, outras estruturas espermáticas como a membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial são essenciais para o sucesso da fertilidade (CELEGHINI et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2014). Estas são estruturas mais vulneráveis aos danos induzidos pelo processo de congelação e descongelação, em comparação ao DNA (GLIOZZI et al., 2017). Além que é a membrana plasmática o local principal onde ocorrem lesões (HAMMERSTEDT; GRAHAM; NOLAN, 1990). Vários trabalhos mostraram a correlação entre integridade das membranas plasmática e acrossomal com fertilidade (BRITO et al., 2003; TARTAGLIONE; RITTA, 2004; GILLAN et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2013a)

As correlações entre diferentes análises do sêmen e a fertilidade relatadas na literatura tem sido muito baixas para levar a uma previsão confiável da fertilidade *in vivo*. No entanto, valores de correlação reportados por Sellem et al. 2015 mostraram que o metabolismo oxidativo tem a maior e positiva correlação ($R^2=0,24$) com fertilidade, em comparação a acrossoma ($R^2=0,10$) e DNA ($R^2=0,082$). Simões et al. 2013 estudaram a relação entre o metabolismo oxidativo no sêmen de touros e a fertilidade *in vitro*, encontrando que as amostras de sêmen mais susceptíveis ao estresse oxidativo resultam em maior redução da taxa de clivagem do embrião *in vitro* (Simões et al., 2013). O estresse oxidativo tem sido determinado como o principal causador de danos nas membranas espermáticas e do DNA (AITKEN; BAKER, 2006). O dogma geral é que são os espermatozoides lesados quem geram mais ROS (GIBB; LAMBOURNE; AITKEN, 2014). Por um lado, baixos níveis de ROS são necessários para promover a oxidação do colesterol e os eventos de fosforilação de tirosina que sustentam a capacitação; por outro lado, a superprodução de ROS pode levar a um estado de estresse oxidativo que compromete a função espermática (AITKEN, 2011). Ao respeito Gibb, Lambourne e Aitken (2014), encontraram o sêmen de cavalos mais férteis apresentavam maior metabolismo oxidativo e maior produção de ROS. A produção de ROS e RNS é importante na modulação dos eventos da fecundação (BUZADZIC et al., 2015). Por tanto, podem ser marcadores de fertilidade *in vivo*. Ainda há muito a pesquisar sobre o papel dos mecanismos oxidativos e a influência na fertilidade. O objetivo do presente trabalho é determinar se o metabolismo oxidativo espermático é um fator chave para detectar as diferenças entre partidas de sêmen com alto e baixo escore de fertilidade. Relacionar o metabolismo oxidativo com fertilidade *in vivo* e detectar como cada característica de qualidade espermática individualmente está influenciando no resultado de fertilidade *in vivo*.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Reagentes

Meio TALP, pH 7.4, (BAVISTER et al., 1983), Albumina sérica bovina (BSA, Sigma–Aldrich St. Louis, MO, USA), Hoescht 33342 (H342, 2,5 mg/mL, Molecular Probes), SYTO-59 (750mM, Molecular probes-S1134), Iodeto de propídio (PI, 0,5 mg/mL, Sigma-Aldrich), YOPRO-1 (7,5 µM, Y3603, Thermo Fisher), Lecitina obtida de *Arachis hypogaea* (PNA), conjugada com FITC (FITC-PNA, 37,5 µg/mL, Sigma-Aldrich, L7381), Aglutinina de *Pisum sativum* conjugada com Isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA, 100 µg/mL, Sigma-Aldrich), iodeto de 5,5',6,6'tetracloro 1,1',3,3'tetraetilbenzimidazolil Carbocianina (JC-1, 153 µM, Sigma-Aldrich), Mitosox Red (MSR, 2 µM, M36008, Molecular Probes), Dihidroetidium® (DHE, 2 µM, D1168-Thermo Fisher), C11-BODIPY^{581/591} (BODIPY, 2 mM, D-3861, Thermo Fisher Inc., Eugene, Oregon, EUA), Dihidrorodamina (DHR, 40 mM, D1054 –Sigma Aldrich), 4,5-diaminofluorescein-2/diacetate (DAF-2/DA, 10 µM, Calbiochem, San Diego, Califórnia, EUA). As sondas foram provenientes da empresa Molecular Probes e Sigma-Aldrich e os protocolos de preparo estão descritos no Apêndice B.

5.2.2 Partidas de sêmen e determinação da fertilidade

Foram recebidas as partidas de sêmen de seis touros da raça Aberdeen Angus com idade entre 6 e 11 anos, pertencentes a uma central de reprodução parceira, que são rotineiramente coletados e suas partidas usadas para fins comerciais. O escore de fertilidade foi determinado pela central de reprodução (Alta Genetics do Brasil, Uberaba, Minas Gerais). A fertilidade foi calculada baseada na média da taxa de prenhez (> 100 IA) e calculando o desvio da média para determinar o escore de fertilidade. Assim foram estabelecidos dos grupos de fertilidade: Alto escore de fertilidade (AF), dados provenientes da recopilação de 29.939 IA em 286 rebanhos e baixo escore de fertilidade (BF), pela informação proveniente de 3.259 IA em 23 rebanhos. O índice de fertilidade de cada touro foi expresso em escore (-

2,44 a +0,53) (Quadro 7). Foram usadas 18 partidas de sêmen, sendo 3 partidas de cada touro de AF (n=9), e 3 partidas de cada touro BF (n=9). Estas palhetas foram armazenadas em botijões de nitrogênio líquido (-196°C) e mantidas no laboratório até as análises.

Quadro 7 – Descrição das partidas de sêmen bovino, escore de fertilidade e taxa de prenhez do grupo de Alta (A) e Baixa (B) fertilidade

Numero	Touro	Escore	Grupo
1	M1	0,536	A
2	M2	0,536	A
3	M3	0,536	A
4	N1	0,495	A
5	N2	0,495	A
6	N3	0,495	A
7	O1	0,284	A
8	O2	0,284	A
9	O3	0,284	A
10	P1	-1,579	B
11	P2	-1,579	B
12	P3	-1,579	B
13	Q1	-1,758	B
14	Q2	-1,758	B
15	Q3	-1,758	B
16	R1	-2,447	B
17	R2	-2,447	B
18	R3	-2,447	B

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

5.2.3 Análises laboratoriais do sêmen

5.2.3.1 Avaliações espermáticas convencionais

Para as primeiras análises duas palhetas do sêmen da mesma partida foram descongeladas em banho-Maria a 37°C durante 30 segundos, o sêmen foi depositado em microtubos (1,5 mL) pré-aquecidos a 37°C, homogeneizado e imediatamente determinada a motilidade subjetiva total, avaliando a porcentagem de espermatozoides móveis no campo óptico (%). Para a determinação do vigor, foi classificado subjetivamente em escores de 1 a 5, sendo 1 referente ao movimento mais lento do espermatozoide e 5 a máxima

movimentação retilínea e velocidade rápida dos espermatozoides, usando para estas análises um microscópio óptico de contraste de fase (Marca Nikon, Modelo E200), em aumento de 100 x. A concentração espermática foi avaliada por meio da diluição do sêmen em uma solução de formol salino tamponado 4%, na proporção de 1:100, sendo colocado 10 µL de sêmen em 990 µL de formol salino tamponado. Para a contagem foi usada câmara de Neubauer sob microscopia de contraste de fase (Marca Nikon, Modelo E200), em aumento de 400 x. Para morfologia espermática, uma alíquota de 50 µL de sêmen foi depositada em um microtubo (1,5 mL) e adicionado 5 µL de formol salino tamponado 4%, homogeneizado e armazenado a 5°C para leitura em até 24 horas. Foi usada a técnica de câmara úmida, colocando uma alíquota de 3 µL do sêmen diluído entre lâmina e lamínula para realizar a contagem de 200 células por amostra, sob microscopia de contraste de interferência diferencial (Modelo 80i, Nikon Tóquio, Japão) com aumento de 1.000 x. As porcentagens das diversas anormalidades morfológicas foram agrupadas e classificadas em defeitos maiores, defeitos menores e defeitos totais (BLOM, 1973).

5.2.3.2 Análise computadorizada da motilidade espermática

As amostras foram avaliadas pelo sistema computadorizado de análise espermática (CASA) usando o software *Sperm Class Analyzer* (SCA[®], Microptic). Inicialmente foram configuradas as características espermáticas, ajustando o Setup para sêmen bovino (30 frames por segundo, tamanho mínimo: 15 microns², tamanho máximo: 70 microns², progressivos: >70% de STR, circulares: <50% LIN, VAP slow cut off: 20,0 µm/s, Rapid cells: VAP Cut-off: 50 µm/s). Para esta análise o sêmen foi diluído em meio TALP (pH: 7.2 – 7.4) a uma concentração de 25×10^6 espermatozoides/mL posteriormente, depositados 10 µL da diluição em uma câmara de leitura padrão (Makler counting chamber, SEFI Medical Instruments LTD, Haifa Israel) previamente aquecida a 37°C. Os características de cinética espermática avaliados foram: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, µm/s), velocidade progressiva (VSL, µm/s), velocidade curvilínea (VCL, µm/s), amplitude lateral da cabeça (ALH, µm), frequência de batimento (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade (LIN, %), células com velocidade rápida (RAPID, %). Foram avaliados 5 campos, escolhendo os campos que não apresentavam artefatos.

5.2.3.3 Avaliação simultânea da integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial

Para esta análise utilizou-se a técnica descrita por Celeghini et al. (2007), que associa quatro sondas fluorescentes (PI, FITC-PSA, JC-1 e H342) para avaliar a integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial, com leitura pela microscopia de epifluorescência. Algumas modificações da técnica são descritas resumidamente: foi utilizada uma amostra de 150 μL de sêmen diluído em meio TALP a 25×10^6 espermatozoides/mL, sendo adicionados: 2 μL de H342, 3 μL de PI, 50 μL de FITC-PSA e 6 μL JC-1. Após a adição das sondas fluorescentes, a amostra foi incubada por 8 minutos a 37°C, no ambiente escuro. A leitura foi realizada sob microscopia de epifluorescência (modelo 80i, Nikon Tóquio, Japão) em aumento de 1.000 x, utilizando-se o filtro triplo (D/F/R, C58420) apresentando os conjuntos UV-2E/C (excitação 340-380 nm e emissão 435-485 nm), B-2E/C (excitação 465-495 nm e emissão 515-555 nm) e G-2E/C (excitação 540-525 nm e emissão 605-655 nm). Foram avaliadas 200 células por amostra, sendo determinada a população de espermatozoides com membrana íntegra, acrossomal íntegro e alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA) e o porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra (MPI), porcentagem de espermatozoides com membrana acrossomal íntegra (MAI) e porcentagem de espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial (APM).

5.2.3.3.1 Análises por citometria de fluxo

Foram utilizadas duas palhetas de sêmen (0,25 mL), estas foram descongeladas a 37°C durante 30 segundos e depositada a amostra em um microtubo de 1,5 mL, homogeneizada e mantidas a 37°C em banho-Maria. O sêmen foi diluído no TALP na concentração de 5×10^6 espermatozoides/mL para um volume final de 2,5 mL, que foram depositados em um tubo cônico (15 mL). Finalmente, após finalizado o tempo de incubação respectivo de cada protocolo, a amostra de sêmen foi diluída novamente com TALP para obter uma concentração de $2,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL e colocados para leitura no citômetro. Todas as análises foram realizados no citômetro de fluxo BD Acurri™ (BD

Biosciences, São José, CA, EUA), configurado com 02 lasers (azul e vermelho), com capacidade de análise simultânea de até 6 características (4 cores, SSC e FSC) (Quadro 8).

Quadro 8 – Características do equipamento de citometria de fluxo Accuri C6 e descrição das sondas fluorescentes utilizadas nas análises

Filtros	Laser	Sondas
FL1 (FL1 533/30 nm)	Azul 488 nm	FITC-PNA, JC1(monômeros), YOPRO-1 BODIPY
FL2 (585/40 nm)	Azul 488 nm	JC1 (J-agregados), MSR, DHE
FL3 (>670 nm)	Azul 488 nm	Iodeto de propidium
FL4 (675/25 nm)	Vermelho 640nm	SYTO-59

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

A detecção das sondas foi otimizada realizando a compensação manual a fim de minimizar a sobreposição de fluorescência e determinar a localização nos quadrantes das diferentes subpopulações (APÊNDICE C). Foram adicionados controles positivos para cada sonda utilizada (APÊNDICE D). Para a detecção das partículas com tamanho e complexidade interna semelhantes aos espermatozoides foram identificadas através do *Dot-plot* forward scatter e side scatter usando a sonda SYTO-59, esta sonda cora o DNA espermático evitando a contagem de forma equivocada de partículas com o mesmo tamanho e granulidade do espermatozoide (ANDRADE, 2009). O SYTO-59[®] com excitação/emissão de 622/645 nm, foi excitado pelo laser vermelho (635nm) e detectado pelo FL4 para separação da população de espermatozoides dos debris. Posteriormente é posicionado um “Gate” sobre a população de espermatozoides e analisados unicamente os espermatozoides. Foram analisados 10,000 espermatozoides (eventos Syto +) por amostra. A taxa de aquisição foi de 600-1000 eventos por segundo.

5.2.3.4 Avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal

Seguindo a técnica descrita por Andrade (2009), com modificações para leitura no citômetro de fluxo BD AcurriTM (BD Biosciences, São José, CA, EUA). Uma alíquota de 150 µL de sêmen (5×10^6 espermatozoides/mL) foi depositada em um microtubo, a seguir,

foram adicionados 2 μL de SYTO-59[®], 1 μL de PI, 1 μL de FITC-PNA, com posterior incubação durante 10 minutos a 37°C. Passado o período de incubação a amostra foi diluída na concentração de $2,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL com adição de TALP. Estas sondas são utilizadas com o objetivo de corar as células com membrana plasmática lesada (PI +) (CELEGHINI et al., 2007; ANDRADE et al., 2007) e com a membrana acrossomal reagida (FITC-PNA +). O FITC-PNA com excitação/emissão de 495 nm/525 nm foi excitado pelo laser azul (488 nm) e detectado pelo FL1, o PI com excitação/emissão de 533 nm/617 nm, foi excitado pelo laser vermelho (635nm) e detectado pelo FL3. Foram identificadas quatro populações (Quadro 9), e os resultados são mostrados em um *Dot-plot* (Figura 5). A população de interesse para as análises foi a população de espermatozoides com membrana plasmática íntegra e acrossoma íntegro (AIMI).

Quadro 9 – Populações espermáticas de acordo com a sonda utilizada para avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal na citometria de fluxo

Sigla	Classificação dos espermatozoides	FITC-PNA	PI
AIML	Membrana plasmática lesada e Membrana acrossomal não reagida	-	+
ARML	Membrana plasmática lesada e Membrana acrossomal reagida	+	+
AIMI	Membrana plasmática íntegra e Membrana acrossomal não reagida	-	-
ARMI	Membrana plasmática íntegra e Membrana acrossomal reagida	+	-

Fonte: Florez-Rodriguez, S.A. (2017)

Figura 5 – Gráfico de pontos (*Dot plot*) e histogramas gerados pela análise por citometria de fluxo na avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal. **A.** *Dot-plot* Side scatter (SSC) x forward scatter (FSC) mostrando o “Gate” de espermatozoides **B.** Histograma os espermatozoides mostrando no FL4-A as partículas marcadas com SYTO-59. **C.** *Dot-plot* observando as quatro subpopulações (AIML, ARML, AIMI, ARMI) formadas pela fluorescência do FITC-PNA (FL1-A) (eixo y) e do PI (FL3-A) (eixo x)

Fonte: Florez-Rodriguez, S.A.

5.2.3.5 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

Esta avaliação foi realizada segundo a técnica desenvolvida por Andrade (2009). Para avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) foi utilizada a sonda JC-1 combinada com o PI, para determinar as células com membrana plasmática lesada. Uma alíquota de 150 μL sêmen (5×10^6 espermatozoides/mL) foi depositada em um microtubo, e adicionados a seguir, 1 μL de JC-1, 1 μL de PI e 2 μL de SYTO-59, incubados por 10 min. a 37°C e, em seguida, diluídas com 150 μL de TALP para se obter uma concentração de $2,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL. O JC-1 foi excitado com laser azul de 488 nm, a detecção dos J-agregados (cor vermelho alaranjada) foi feita no FL2-A (580 nm), enquanto que, os monômeros (cor verde) foram lidos no FL1-A (530 nm). A detecção do PI foi feita no FL3. Estas análises permitem identificar quantitativamente quatro populações (Quadro 10), foi gerado um gráfico de *Dot-plot* para visualizar as populações (Figura 6). Para fins da estatística considerou-se a população de espermatozoides com membrana íntegra e alto potencial mitocondrial (MIHP). A avaliação qualitativa do potencial de membrana mitocondrial foi realizada mediante a detecção da taxa de despolarização da mitocôndria ou perda do potencial ($\Delta\psi_m$), visualizada no gráfico de *Dot-plot* do quadrante 2, a porcentagem de células no FL2 observadas no quadrante UR (Q2-UR) foi dividida pela porcentagem de células no FL1 observadas no quadrante UL (Q2-UL), o valor resultante é um indicador da relação entre o alto potencial e o baixo potencial (Relação H:L).

Quadro 10 – Populações espermáticas obtidas pela citometria de fluxo utilizando as sondas JC-1 e Iodeto de propídeo (PI) para avaliação do potencial de membrana mitocondrial

Sigla	Classificação dos espermatozoides	JC-1 Laranja	PI
MIHP	Membrana íntegra e alto potencial mitocondrial	+	-
MILP	Membrana íntegra e baixo potencial mitocondrial	-	-
MLHP	Membrana lesada e alto potencial mitocondrial	+	+
MLLP	Membrana lesada e baixo potencial mitocondrial	-	+

Fonte: Florez-Rodriguez, S.A. (2017)

Figura 6 – Gráfico de pontos (*Dot plot*) gerados pela análise por citometria de fluxo na avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$). **A.** *Dot-plot* mostrando a detecção das quatro subpopulações espermáticas (MLLP, MLHP, MILP, MIHP) geradas pela combinação da fluorescência laranja do JC-1 com leitura no filtro FL2-A (eixo y) e a fluorescência do PI com leitura no FL3-A (eixo x) **B.** *Dot-plot* do quadrante 2 (Q2) mostrando a os espermatozoides positivos para a fluorescência dos monômeros do JC-1 no FL1-A (eixo y) e os positivos para a fluorescência Laranja no FL2-A (eixo x)

Fonte: Florez-Rodriguez, S.A.

5.2.3.6 Produção de anião superóxido pela mitocôndria espermática

Foi utilizada a técnica descrita por Gürlér (2015) para sêmen de bovino, para estimar a quantidade de $O_2 \cdot^-$ produzido pela mitocôndria. Uma alíquota de 150 μ L da amostra de sêmen diluída no TALP (5×10^6 espermatozoides/mL) foi depositada em um microtubo com 1,5 μ L de MSR e incubados durante 30 minutos a 37°C. Depois de 10 minutos foi adicionado 1 μ L de YOPRO-1 e outros 10 minutos depois foi adicionado 1,5 μ L de SYTO-59. Cumpridos os 30 minutos da incubação, foram adicionados 150 μ L de TALP para deixar a amostra na concentração de $2,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL.

A excitação da fluorescência do MSR (vermelho) foi conseguida com o laser azul (488 nm) e a detecção usando o FL2-A (585/40 nm). O YOPRO-1 pode ser excitado pelo laser azul (488nm) e detectado no FL1-A (533/30 nm). O SYTO-59 pode ser excitado pelo laser vermelho (635nm) com excitação/emissão de 622 nm/645 nm pode ser detectado pelo FL4 (675/25 nm). Os resultados foram expressos como a percentagem de células (YOPRO -) coradas positivamente com MSR (MITO_MI), assim como os valores absolutos em unidades arbitrárias (ua) da mediana da intensidade de fluorescência emitida pelos espermatozoides positivos para MSR (MITOi) (Figura 7).

Figura 7 – Histograma e gráfico de pontos (*Dot plot*) gerados pela análise por citometria de fluxo na avaliação da produção de ânion superóxido **A**. Histograma da população de células positivas e negativas para Mitosox Red (MSR), a intensidade de fluorescência detectada pelo FL2-A, o valor obtido é a mediana em unidades arbitrárias (ua) do MSR+ **B**. *Dot-plot* da porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra (YOPRO-1 negativo) com leitura no FL1-A e marcados positivamente com MSR com leitura no FL2-A

Fonte: Florez-Rodriguez, S.A.

5.2.3.7 Presença de espécies reativas de oxigênio citoplasmática

Foi usado o DHE para estimar o ânion superóxido citoplasmático, quando o DHE é oxidado pelo $O_2^{\bullet -}$, se liga ao DNA e gera uma fluorescência vermelha (KOOPERS et al., 2008). Uma alíquota de 150 μ L de sêmen (5×10^6 espermatozoides/mL) foi depositada em um microtubo e adicionados 1 μ L de DHE e colocados para incubação a 37°C e protegido da luz, depois de 10 min. foi adicionado a este meio de incubação 1 μ L de YOPRO-1 e cumpridos 10 minutos foi adicionado 2 μ L de SYTO-59 e passados 10 minutos foi realizada a leitura. Os resultados foram obtidos a partir do histograma (Figura 8), mostrando os espermatozoides (PI-) positivos para DHE. O valor usado se refere à mediana da intensidade de fluorescência (DHEi), dessa porcentagem de espermatozoides positivos.

Figura 8 – Histograma da análise da produção de espécies reativas citoplasmáticas com Dihidroetidium (DHE), mostrando a população de células positivas e negativas para DHE, a intensidade de fluorescência detectada pelo FL2-A

Fonte: Florez-Rodriguez, S.A. (2017)

5.2.3.8 Avaliação da peroxidação lipídica

Em uma alíquota de 150 μL de sêmen (5×10^6 espermatozoides/mL) foi adicionado 1 μL da sonda C11-BODIPY^{581/591} (2 mM, D-3861, Thermo Fisher Inc., Eugene, Oregon, EUA) e incubada por 30 minutos a 37°C. Passados 20 minutos do tempo inicial, foi adicionado 1 μL de PI (0,5 mg/mL, Sigma-Aldrich, P4170) junto com 2 μL de SYTO-59[®] (750 mM, Molecular probes-S1134). No fim dos 30 minutos de incubação foram adicionados 150 μL de TALP para deixar a amostra na concentração de $2,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL. O BODIPY^{581/591} foi excitado pelo laser 488 nm, o FL1-A foi utilizado para medir a fluorescência verde, ou seja, com elevada peroxidação lipídica. O FL3-A para detectar a fluorescência do PI, separando os espermatozoides com membrana lesada e retirando da análise da peroxidação. O valor absoluto da mediana da intensidade de fluorescência do BODIPY^{581/591} (BODIPYi) foi detectada pelo FL1 e indica a quantidade de peroxidação lipídica dos espermatozoides vivos por amostra (Figura 9).

Figura 9 – Histograma da análise da peroxidação lipídica por citometria de fluxo, mostrando a população de células positivas e negativas para BODIPY581/591

Fonte: Florez-Rodriguez, S.A.

5.2.3.9 Detecção de peroxinitrito (ONOO⁻) e derivados

Utilizou-se a sonda Dihidrorodamina (DHR, 40 mM, D1054 –Sigma Aldrich) para determinar as espécies reativas ao nitrogênio: peroxinitrito (ONOO⁻), radicais nitrogendioxido (NO₂[•]) e peroxidasas como descrito por Gürler (2015). Algumas modificações feitas para leitura no Citômetro, resumidamente, em uma alíquota de 150 μL

sêmen foi diluído em TALP contendo 5×10^6 espermatozoides/mL foi adicionado 3 μ L DHR (40 mM, D1054 –Sigma Aldrich), 2 μ L de SYTO-59[®] (750 mM, Thermo Fisher-S1134) e 1 μ L de iodeto de propídio (0,5 mg/mL, Sigma-Aldrich, P4170). Foram incubadas a 37°C no escuro por 30 min. Aproximadamente 10.000 eventos foram analisados por amostra. A DHR é Rodamina 123 oxidada, que mostra uma fluorescência verde e pode ser excitada utilizando o Laser 488 nm. O FL1-A foi utilizado para a detecção do DHR (fluorescência verde). O PI com excitação/emissão de 533/617 nm foi excitado pelo laser vermelho (635 nm) e detectado pelo FL3-A e o SYTO-59[®] com excitação/emissão de 622/645 nm, foi excitado pelo laser vermelho (635 nm) e detectado pelo FL4. Foi utilizado o valor absoluto da mediana da intensidade de fluorescência do DHR positivo (DHRi) (Figura 10).

Figura 10 – Histograma gerado pela análise por citometria de fluxo da produção de espécies reativas de nitrogênio (peroxinitrito - ONOO⁻ e derivados) mostrando a população de células positivas e negativas para DHRi no FL1-A

Fonte: Florez-Rodriguez, S.A.

5.2.3.10 Detecção do Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) intracelular foi medido usando a sonda 4,5-diaminofluoresceína-2/diacetate (DAF-2/DA, 10 μ M, Calbiochem, San Diego, California, EUA)) descrita por Lampaio, Strijdom, Plessis (2006). Alíquotas de 150 μ L de sêmen diluído em TALP (5×10^6 espermatozoides/mL) foram adicionados 1 μ L da sonda DAF-2/DA e incubados a 37 °C/20 min. Após a incubação 1 μ L de PI (0,5 mg/mL) e 1,5 μ L de SYTO 59[®] (750 mM) foram adicionados e incubados por mais 10 min a 37°C. Em seguida, a amostra foi analisada por citometria de fluxo e as células viáveis (PI negativa) marcadas com a DAF-2/DA foram avaliadas quanto ao valor absoluto da mediana da intensidade de fluorescência captada.

A DAF-2/DA é excitada utilizando o Laser 488 nm. O FL1-A foi utilizado para a detecção da intensidade positiva (fluorescência verde). O PI com excitação/emissão de 533/617 nm foi excitado pelo laser vermelho (635nm) e detectado pelo FL3-A e o SYTO-59[®] com excitação/emissão de 622/645 nm, foi excitado pelo laser vermelho (635 nm) e detectado pelo FL4. As células integras (PI-) e marcadas com DAF2-DA foram analisadas, utilizando o valor absoluto da mediana da intensidade de fluorescência (DAFi), assim como a porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra e positivos para DAF2-DA (DAF_MI). O valor obtido é indicado como a mediana em unidades arbitrárias (ua) (Figura 11).

Figura 11 – Gráfico de pontos gerados pela análise por citometria de fluxo da produção de óxido nítrico pela sonda 4,5-diaminofluorescein-2/diacetate (DAF2-DA). **A.** Histograma da população de células positivas e negativas para DAF2-DA. **B.** Dot-plot da porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra e marcados positivamente para DAF (DAF_MI)

Fonte: Florez-Rodriguez, S.A

5.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram separados pelo escore de fertilidade em dois grupos: Alta fertilidade e Baixa fertilidade. Assim, para avaliar o resultado das análises convencionais, CASA, avaliação da integridade de membranas plasmática, acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e avaliação dos marcadores mitocondriais pela citometria de fluxo frente os grupos de fertilidade determinados, foi utilizado o procedimento PROC MIXED o programa SAS (versão 9.3, SAS Instituto Inc., Cary, NC, EUA). Em caso de efeitos significativos foi utilizado o Teste de Tukey considerando um nível de significância de 5%. Os resultados são apresentados com estimativas de médias e erro padrão. Para avaliação do escore de fertilidade

em função de cada característica espermática, os dados foram separados em quartis, para dividir os grupos em valores inferiores, médios e superiores de todas as variáveis já mencionadas. Posteriormente, foi utilizado o procedimento PROC GLIMMIX do programa SAS, sob a metodologia dos modelos lineares generalizado, considerando a variável com distribuição binomial e função de ligação logística. Todos os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo que, em presença de efeito significativo, os dados foram avaliados pelo teste de Tukey considerando um nível de significância de 5%. Quando os dados foram estatisticamente significativos a nível de 10% se determinou como tendência estatística. Adicionalmente foi realizada uma correlação de Pearson para verificar relações entre as variáveis estudadas usando o programa estatístico R (R versão 3.3.1 (2016-06-21)).

5.4 RESULTADOS

5.4.1 Estatística descritiva

Amostras de sêmen com escore de fertilidade definido pela central foram catalogadas em dois grupos: Alta fertilidade (AF), sendo 3 touros com escore entre 0,284 até 0,536 (TP% $56,25 \pm 1,91$) e Baixa fertilidade (BF), sendo 3 touros com escore entre -1,579 até -2,447 ($45,6 \pm 8,47$). A média da fertilidade foi diferente para AF e BF ($P < 0,05$). Os resultados da análise por técnicas convencionais (Tabela 16), mostrou que os grupos de alta e de baixa fertilidade não diferem em estas características espermáticas ($P > 0,05$).

Tabela 16 – Média ($\pm$ Erro padrão) das características espermáticas avaliadas por técnicas convencionais nos grupos de alta fertilidade e baixa fertilidade

Características espermáticas	Fertilidade		Valor de P
	Alta	Baixa	
Motilidade subjetiva (%)	66,66 ($\pm 2,29$)	61,3889 ($\pm 2,29$)	0,1292
Vigor (escore 1-5)	3,38 ($\pm 0,16$)	3,25 ($\pm 0,16$)	0,5612
Conc. Pal. ($\times 10^6$) ¹	24,58 ($\pm 1,79$)	22,7083 ($\pm 1,79$)	0,4741
Conc. Mov. Pal. ($\times 10^6$) ²	16,33 ($\pm 1,38$)	14,0174 ($\pm 1,38$)	0,261
Defeitos totais (%)	29,5 ($\pm 5,73$)	32,8889 ($\pm 5,73$)	0,6833

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

Legenda: Conc.Pal: Número de espermatozoides($\times 10^6$) por palheta, Conc. Mov. Pal: Número de espermatozoides móveis ($\times 10^6$) por palheta

Os animais de alta fertilidade tiveram valores menores de VCL ($145,08 \pm 6,57$ um/s) comparado aos de baixa fertilidade ($170,69 \pm 6,57$ um/s). O valor de VAP também foi menor no grupo de alta fertilidade ($P=0,0119$). O ALH tendeu a ser menor para o grupo de alta fertilidade ($P=0,0755$). As outras características do CASA foram similares entre os grupos (Tabela 17).

Pela análise por microscopia de epifluorescência com o uso de sondas fluorescentes não foi observada diferença estatística entre os grupos de alta e baixa fertilidade (Tabela 18). Para acrossoma (IMA%) houve uma tendência do valor de integridade do acrossoma, já que mostra-se numericamente menor para os animais de alta fertilidade ($P=0,0773$).

Tabela 17 – Média ($\pm$ Erro padrão) das características da motilidade espermáticas avaliadas pelo sistema CASA, nos grupos de alta fertilidade e baixa fertilidade

Características espermáticas	Fertilidade		Valor de P
	Alta fertilidade	Baixa fertilidade	
MT (%)	75,91($\pm 2,93$)	71,63 ($\pm 2,93$)	0,3229
MP (%)	55,95($\pm 2,43$)	52,35 ($\pm 2,43$)	0,3163
RAP (%)	70,13 ($\pm 2,90$)	65,94 ($\pm 2,90$)	0,3275
VCL (um/s)	145,08 ($\pm 6,57$) ^b	170,69 ($\pm 6,57$) ^a	0,0174*
VSL (um/s)	79,62 ($\pm 2,27$)	83,36 ($\pm 2,27$)	0,268
VAP (um/s)	96,57 ($\pm 1,65$) ^b	103,5 ($\pm 1,65$) ^a	0,0119*
LIN (%)	55,03 ($\pm 2,85$)	49,1 ($\pm 2,85$)	0,167
STR (%)	82,31 ($\pm 1,85$)	80,57 ($\pm 1,85$)	0,5203
ALH (um)	2,65 ($\pm 0,27$)	3,4 ($\pm 0,27$)	0,0755
BCF (Hz)	22,21 ($\pm 1,10$)	23,11 ($\pm 1,10$)	0,5757

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

Legenda: Motilidade total (MT), Motilidade progressiva (MP), Células rápidas (RAP), Velocidade curvilínea (VCL), Velocidade progressiva (VSL), Velocidade do trajeto (VAP), Linearidade (LIN), Retilinearidade (STR), Deslocamento lateral da cabeça (ALH), Frequência de batimentos da cauda (BCF)

*^{ab} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P<0,05$) no teste de Tukey

Tabela 18– Média ($\pm$ Erro padrão) das características espermáticas avaliadas pelo uso de sondas fluorescentes, para leitura com microscopia de epifluorescência: nos grupos de alta fertilidade e baixa fertilidade

Características espermáticas	Fertilidade		Valor de P
	Alta	Baixa	
PIAIA (%)	41,33 ($\pm 3,45$)	42,55($\pm 3,45$)	0,8068
PLALS (%)	39,33 ($\pm 4,51$)	35,77 ($\pm 4,51$)	0,588
IMP (%)	42,94 ($\pm 5,08$)	48,72 ($\pm 5,08$)	0,4372
IMA (%)	51,44 ($\pm 2,31$)	57,77 ($\pm 2,31$)	0,0773

APM (%)	54,83 ($\pm$ 6,31)	52,33 ($\pm$ 6,31)	0,7844
---------	---------------------	---------------------	--------

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

Legenda: Porcentagem de células com integridade de membrana plasmática e acrossomal com alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA), porcentagem de células com lesão da membrana plasmática e acrossomal com baixo potencial de membrana mitocondrial (PLALS) e as características individuais: integridade de membrana plasmática (IMP) integridade de membrana acrossomal (IMA) e alto potencial de membrana mitocondrial (APM)

^{*ab} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$) no teste de Tukey

Notou-se que pelas análises de citometria de fluxo que algumas variáveis tiveram valores superiores no grupo de alta fertilidade, mas a maioria das características seminais estudadas não foram diferentes entre alta e baixa fertilidade, embora numericamente são observados valores superiores no AF, possivelmente não se conseguiu a diferença estatística devido ao coeficiente de variação entre partidas (Tabela 19). Exceto pela avaliação do DAFi, mostrando que os animais de AF possuem maior produção de óxido nítrico (NO) do que o grupo de baixa fertilidade ($5230,5 \pm 434,56$ e $3480,28 \pm 434,56$, respectivamente).

Tabela 19 - Média ($\pm$ Erro padrão) das características espermáticas avaliadas por citometria de fluxo pelo uso de sondas fluorescentes, nos grupos de alta fertilidade de fertilidade e baixa fertilidade

Características espermáticas	Fertilidade		Valor de P
	Alta	Baixa	
MAI (%)	48,85 ($\pm$ 6,23)	44,31 ($\pm$ 6,23)	0,6162
MAI (%)	80,74 ($\pm$ 3,60)	74,31 ($\pm$ 3,60)	0,2313
MIHP (%)	23,94 ($\pm$ 2,81)	23,79 ($\pm$ 2,89)	0,9714
Ratio_H:L	3,08 ($\pm$ 1,08)	1,39 ($\pm$ 1,12)	0,3028
MITOi (ua)	632,04 ($\pm$ 54,59)	599,06 ($\pm$ 51,46)	0,6687
MITO_MI (%)	5,30 ($\pm$ 1,19)	4,10 ($\pm$ 1,16)	0,4862
DHEi (ua)	500,94 ($\pm$ 52,76)	456,33 ($\pm$ 52,76)	0,5611
BODIPYi (ua)	2119,94 ($\pm$ 511,63)	2735,44 ($\pm$ 511,63)	0,4116
DAF_MI (%)	32,85 ($\pm$ 3,79)	32,84 ($\pm$ 3,79)	0,9992
DAFi (ua)	5230,5 ($\pm$ 434,56) ^a	3480,28 ($\pm$ 434,56) ^b	0,0147*
DHRi (ua)	1082,89 ($\pm$ 142,11)	1125,17 ($\pm$ 142,11)	0,8369

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

Legenda: Porcentagem de células com integridade de membrana plasmática e acrossoma (MAI), Integridade de membrana acrossomal (MAI), Integridade de membrana plasmática (MI), células com membrana íntegra e alto potencial mitocondrial (MIHP), Relação entre alto e baixo potencial de membrana mitocondrial (Ratio H:L), Intensidade de fluorescência da sonda Mitosox Red (MITOi), porcentagem de células com integridade de membrana e espécies reativas de oxigênio mitocondriais (MITO_MI), Intensidade de fluorescência da sonda Dihidroetidium (DHEi), Intensidade de fluorescência da sonda C11-BODIPY (581/591), (BODIPYi), Intensidade de fluorescência da sonda 4,5-diaminofluoresceína-2/diacetato (DAFi), porcentagem de células com DAF positivo e membrana íntegra (DAF_MI), Intensidade de fluorescência da sonda Dihidrorodamina (DHRi).

^{*ab} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$) no teste de Tukey

5.4.2 Estatística da separação por quartis

Foram distribuídos os dados das características espermáticas por quartis, obtendo três grupos: quartil 1 (Inferior) com os valores inferiores, quartil 2 (Médio) com os valores intermediários e quartil 3 (Superior) com os valores superiores. Foi observado que entre maior for a motilidade subjetiva, maior era o escore de fertilidade ($P=0,07$). O resto de características da análise convencional não mostraram diferença estatística que relacione com o escore de fertilidade (Tabela 20).

Pelo CASA, as características espermáticas que tiveram efeito do escore de fertilidade foram o VCL e o VAP, para estas características os valores inferiores obtiveram maior escore de fertilidade ($P<0,05$). A LIN pelo contrário, quanto maior o valor de LIN foi maior o escore de fertilidade ($P<0,05$). O ALH é uma variável negativa, o quartil inferior mostrou um melhor escore de fertilidade que os quartis médio e superior ($P<0,05$), (Tabela 21).

Tabela 20– Média ($\pm$ Erro padrão) das características espermáticas avaliadas por técnicas convencionais e seu efeito sobre o escore de fertilidade, nos grupos estabelecidos pela separação de quartis: Inferior, Médio e Superior

Características espermáticas	Quartis			Valor de P
	Inferior	Médio	Superior	
Motilidade subjetiva (%)	58,33($\pm$ 2,04)	64,50($\pm$ 1,12)	68,57 ($\pm$ 1,34)	0,0706
Escore de Fertilidade	-1,66 ($\pm$ 0,45)	-0,11 ($\pm$ 0,49)	-0,4 ($\pm$ 0,42)	
Vigor (1 – 5)	3,0($\pm$ 0,29)	3,0 ($\pm$ 0,0)	3,52 ($\pm$ 0,08)	
Escore de Fertilidade	-1,05($\pm$ 0,47)	-1,05($\pm$ 0,47)	-0,54 ($\pm$ 0,38)	0,4231
Conc. Mov. Pal ($\times 10^6$)	11,41 ($\pm$ 1,50)	15,17 ($\pm$ 1,47)	18,95 ($\pm$ 1,46)	0,505
Escore de Fertilidade	-1,26 ($\pm$ 1,00)	-0,43 ($\pm$ 1,21)	-0,71 ($\pm$ 1,58)	
Defeitos Totais (%)	17,80 ($\pm$ 4,28)	29,31 ($\pm$ 4,85)	47,60 ($\pm$ 6,35)	
Escore de Fertilidade	-0,37 ($\pm$ 0,57)	-1,05 ($\pm$ 0,45)	-0,62 ($\pm$ 0,57)	0,6358

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

Legenda: Número de espermatozoides móveis ($\times 10^6$) por palheta (Conc. Mov. Pal)

*^{ab} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P<0,05$) no teste de Tukey

Observou-se pela porcentagem de IMA que houve melhor escore de fertilidade quando haviam menos espermatozoides com acrossoma íntegros na amostra ($P=0,026$). As

outras características espermáticas pela análise de sondas fluorescentes por microscopia de epifluorescência não apresentaram diferenças entre os quartis formados (Tabela 22).

Tabela 21– Média ($\pm$ Erro padrão) das características da motilidade espermática avaliadas pelo sistema computadorizado da motilidade (CASA): e seu efeito no escore de Fertilidade, nos grupos estabelecidos pela separação de quartis: Inferior, Médio e Superior

Características espermáticas	Quartis			Valor de P
	Inferior	Médio	Superior	
MT (%)	63,76 ($\pm$ 4,58)	73,23 ($\pm$ 4,29)	84,66 ($\pm$ 1,78)	
Escore de Fertilidade	-1,38 ($\pm$ 0,55)	-0,33 ($\pm$ 0,43)	-0,76 ($\pm$ 0,55)	0,362
MP (%)	46,34 ($\pm$ 3,29)	53,78 ($\pm$ 1,90)	62,58 ($\pm$ 3,81)	
Escore de Fertilidade	-1,55 ($\pm$ 0,50)	-0,05 ($\pm$ 0,39)	-1,03 ($\pm$ 0,50)	0,0837
RAP (%)	58,24 ($\pm$ 5,81)	68,11 ($\pm$ 3,35)	77,72 ($\pm$ 2,83)	
Escore de Fertilidade	-1,38 ($\pm$ 0,55)	-0,70 ($\pm$ 0,43)	-0,16 ($\pm$ 0,55)	0,3266
VCL (μ m/s)	140,55 ($\pm$ 6,27)	157,24 ($\pm$ 8,56)	179,58 ($\pm$ 5,29)	
Escore de Fertilidade	0,39 ($\pm$ 0,35) ^a	-0,87 ($\pm$ 0,33) ^b	-1,92 ($\pm$ 0,39) ^b	0,0021*
VSL (μ m/s)	73,40 ($\pm$ 5,19)	81,65 ($\pm$ 2,41)	89,34 ($\pm$ 2,61)	
Escore de Fertilidade	-0,56 ($\pm$ 0,58)	-0,66 ($\pm$ 0,46)	-1,04 ($\pm$ 0,58)	0,8315
VAP (μ m/s)	93,55 ($\pm$ 4,48)	100,36 ($\pm$ 1,69)	105,37 ($\pm$ 2,74)	
Escore de Fertilidade	0,47 ($\pm$ 0,38) ^a	-1,22 ($\pm$ 0,41) ^b	-1,44 ($\pm$ 0,35) ^b	0,0049*
LIN %	45,32 ($\pm$ 1,00)	51,04 ($\pm$ 3,6)	60,46 ($\pm$ 1,83)	
Escore de Fertilidade	-1,92 ($\pm$ 0,46) ^b	-0,44 ($\pm$ 0,36) ^a	-0,04 ($\pm$ 0,46) ^{ab}	0,0268*
STR %	75,42 ($\pm$ 1,38)	81,83 ($\pm$ 2,32)	86,89 ($\pm$ 1,43)	
Escore de Fertilidade	57,87 ($\pm$ 0,012)	54,31 ($\pm$ 0,011)	58,36 ($\pm$ 0,013)	0,7964
ALH %	2,55 ($\pm$ 0,12)	2,87 ($\pm$ 0,15)	3,82 ($\pm$ 0,37)	
Escore de Fertilidade	0,056 ($\pm$ 0,415) ^a	-0,58 ($\pm$ 0,38) ^a	-1,92 ($\pm$ 0,45) ^b	0,0182*
BCF %	20,54 ($\pm$ 0,37)	22,41 ($\pm$ 0,51)	24,72 ($\pm$ 2,10)	
Escore de Fertilidade	-0,58 ($\pm$ 0,58)	-0,66 ($\pm$ 0,49)	-0,97 ($\pm$ 0,53)	0,8665

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

Legenda: Motilidade total (MT), Motilidade progressiva (MP), Células rápidas (RAP), Velocidade curvilínea (VCL), Velocidade progressiva (VSL), Velocidade do trajeto (VAP), Linearidade (LIN), Retilinearidade (STR), Deslocamento lateral da cabeça (ALH), Frequência de batimentos da cauda (BCF)

*^{ab} Letras diferentes na mesma linha diferem significativamente ($P < 0,05$) no teste de Tukey

Foram encontradas influências da população com acrossoma íntegro e membrana íntegra (MAI). Quando a integridade do acrossoma é baixa (< 40) é relacionado à baixa fertilidade em comparação aos valores médios, mas, não difere do quartil com valores superiores. O mesmo aconteceu para os valores de MI, sendo que os valores médios são os de melhor fertilidade ($P = 0,0117$). Em relação à produção de NO avaliado pelo DAFi, o quartil inferior mostrou um escore mais baixo de fertilidade do que o quartil médio e superior. Quando a produção de NO (NO) teve baixa detecção pela intensidade de fluorescência do DAFi (ua) o escore de fertilidade foi negativo (-1,92). Os demais resultados da citometria estão na Tabela 23.

Tabela 22– Média ($\pm$ Erro padrão) das características espermáticas avaliadas pelo uso de sondas fluorescentes, para leitura com microscopia de epifluorescência e seu efeito no escore de fertilidade, nos grupos estabelecidos pela separação de quartis: Inferior, Médio e Superior

Características espermáticas	Quartis			Valor de P
	Inferior	Médio	Superior	
PIAIA (%)	33,30 ($\pm$ 2,14)	41,06 ($\pm$ 3,60)	52,00 ($\pm$ 2,74)	
Escore de Fertilidade	-0,36 ($\pm$ 0,56)	-0,63 ($\pm$ 0,44)	-1,30 ($\pm$ 0,56)	0,4917
PLALS (%)	25,60 ($\pm$ 4,94)	38,13 ($\pm$ 2,64)	48,60 ($\pm$ 1,64)	
Escore de Fertilidade	-1,25 ($\pm$ 0,57)	-0,61 ($\pm$ 0,45)	-0,44 ($\pm$ 0,57)	0,5750
IMP (%)	34,70 ($\pm$ 2,71)	43,63 ($\pm$ 3,81)	60,50 ($\pm$ 7,44)	
Escore de Fertilidade	0,05 ($\pm$ 0,53)	-0,89 ($\pm$ 0,42)	-1,30 ($\pm$ 0,53)	0,2139
IMA (%)	44,90 ($\pm$ 5,42)	55,33 ($\pm$ 2,71)	60,93 ($\pm$ 2,76)	
Escore de Fertilidade	0,46 ($\pm$ 0,46) ^a	-1,15 ($\pm$ 0,42) ^b	-1,25 ($\pm$ 0,39) ^b	0,026*
APM (%)	40,30 ($\pm$ 2,02)	52,44 ($\pm$ 7,05)	68,70 ($\pm$ 2,93)	
Escore de Fertilidade	-0,79 ($\pm$ 0,56)	-0,39 ($\pm$ 0,45)	-1,25 ($\pm$ 0,56)	0,5116

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

Legenda: Porcentagem de células com integridade de membrana plasmática e acrossomal com alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA), porcentagem de células com lesão da membrana plasmática e acrossomal com baixo potencial de membrana mitocondrial (PLALS) e as características individuais: integridade de membrana plasmática (IMP) integridade de membrana acrossomal (IMA) e alto potencial de membrana mitocondrial (APM)

^{*ab} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$) no teste de Tukey

Tabela 23– Média ($\pm$ Erro padrão) das características espermáticas avaliadas com o uso de sondas fluorescentes pela citometria de fluxo. Nos grupos: Alta (A), Média (M) e Baixa fertilidade (B)

Características espermáticas	Quartis			Valor de P
	Inferior	Médio	Superior	
MAIA (%)	35,30 ($\pm$ 4,43)	46,00 ($\pm$ 4,29)	58,80 ($\pm$ 5,25)	
Escore de Fertilidade	-1,65 ($\pm$ 0,44) ^b	0,14 ($\pm$ 0,34) ^a	-1,27 ($\pm$ 0,44) ^b	0,0117*
MAI (%)	55,33 ($\pm$ 2,71)	60,93 ($\pm$ 2,76)	86,75 ($\pm$ 1,76)	
Escore de Fertilidade	-1,36 ($\pm$ 0,55) ^b	-0,73 ($\pm$ 0,43)	-1,13 ($\pm$ 0,55)	0,3161
MI (%)	35,66 ($\pm$ 4,37)	46,19 ($\pm$ 4,26)	58,98 ($\pm$ 5,32)	
Escore de Fertilidade	-1,65 ($\pm$ 0,44) ^b	0,14 ($\pm$ 0,34) ^a	-1,27 ($\pm$ 0,44) ^b	0,0117*
MIHP (%)	18,49 ($\pm$ 1,82)	22,59 ($\pm$ 1,79)	31,12 ($\pm$ 5,13)	
Escore de Fertilidade	-0,41 ($\pm$ 0,58)	-0,95 ($\pm$ 0,49)	-0,76 ($\pm$ 0,53)	0,7832
Ratio H:L	0,55 ($\pm$ 0,20)	1,22 ($\pm$ 0,29)	3,11 ($\pm$ 2,14)	
Escore de Fertilidade	-0,96 ($\pm$ 0,53)	-0,92 ($\pm$ 0,45)	0,06 ($\pm$ 0,53)	0,3179
MITO-MI (%)	2,21 ($\pm$ 0,60)	4,82 ($\pm$ 1,42)	7,39 ($\pm$ 0,74)	
Escore de Fertilidade	-1,04 ($\pm$ 0,55)	-1,15 ($\pm$ 0,47)	-0,07 ($\pm$ 0,55)	0,3229
MITOi	434,90 ($\pm$ 81,21)	635,19 ($\pm$ 51,56)	765,40 ($\pm$ 102,18)	
Escore de Fertilidade	-1,41 ($\pm$ 0,55)	-0,25 ($\pm$ 0,46)	-0,95 ($\pm$ 0,55)	0,2957
DHEi	308,00 ($\pm$ 65,52)	479,38 ($\pm$ 51,31)	648,10 ($\pm$ 145,86)	
Escore de Fertilidade	-0,62 ($\pm$ 0,58)	-0,97 ($\pm$ 0,46)	-0,5 ($\pm$ 0,58)	0,7942
BODIPYi	1423,20 ($\pm$ 372,78)	2288,69 ($\pm$ 438,28)	3654,60 ($\pm$ 860,90)	
Escore de Fertilidade	-0,44 ($\pm$ 0,51)	-0,32 ($\pm$ 0,40)	-1,72 ($\pm$ 0,51)	0,1156
DAF-MI (%)	19,64 ($\pm$ 6,56)	32,93 ($\pm$ 3,86)	32,930 ($\pm$ 3,86)	
Escore de Fertilidade	-0,81 ($\pm$ 0,57)	-0,46 ($\pm$ 0,45)	-1,12 ($\pm$ 0,57)	0,6727
DAFi	2497,40 ($\pm$ 1234,41)	4211,58 ($\pm$ 573,45)	5805,79 ($\pm$ 433,76)	
Escore de Fertilidade	-1,92 ($\pm$ 0,46) ^b	-0,28 ($\pm$ 0,42) ^a	-0,26 ($\pm$ 0,39) ^a	0,0257*
DHRi	732,90 ($\pm$ 251,26)	1088,94 ($\pm$ 67,77)	1499,30 ($\pm$ 278,52)	

Escore de Fertilidade	-0,72 ($\pm$ 0,58)	-0,97 ($\pm$ 0,46)	-0,39 ($\pm$ 0,58)	0,742
-----------------------	---------------------	---------------------	---------------------	-------

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

Legenda: Porcentagem de células com integridade de membrana plasmática e acrossoma (MAI), Integridade de membrana acrossomal (MAI), Integridade de membrana plasmática (MI), células com membrana íntegra e alto potencial mitocondrial (MIHP), Relação entre alto e baixo potencial de membrana mitocondrial (Ratio H:L), Intensidade de fluorescência da sonda Mitosox Red (MITOi), porcentagem de células com integridade de membrana e espécies reativas de oxigênio mitocondriais (MITO_MI), Intensidade de fluorescência da sonda Dihidroetidium (DHEi), Intensidade de fluorescência da sonda C11-BODIPY (581/591)(BODIPYi), Intensidade de fluorescência da sonda 4,5-diaminofluorescein-2/diacetate (DAFi), porcentagem de células com DAF positivo e membrana íntegra (DAF-MI), Intensidade de fluorescência da sonda Dihidrorodamina (DHRi),

^{*ab} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$) no teste de Tukey

5.4.3 Correlações da taxa de prenhez com análises convencionais e análises objetivas

A tabela 24 mostra os valores da correlação (r) e significância (p) entre a taxa de prenhez e as características seminais avaliadas. No geral foi observado que a Motilidade subjetiva teve um coeficiente alto de correlação ($r=0,62$; $p=0,0064$), mas a Motilidade total avaliada pelo CASA não teve correlação, mas das outras características do CASA, o VAP e o VCL tiveram correlação negativa com relação a taxa de prenhez. A integridade do acrossoma e a presença de óxido nítrico foram positivamente correlacionados ($p < 0,05$).

Tabela 24 – Coeficientes de correlação de Pearson entre a taxa de prenhez dos grupos de alta e baixa fertilidade e as análises convencionais e análises objetivas (CASA e sondas fluorescentes)

Característica espermática	Coeficiente r	Valor de p
Motilidade subjetiva (%)	0.62	0.0064*
Vigor (escore 1-5)	0.44	0.067*
Conc. Pal. ($\times 10^6$) ¹	0.37	0.134
Conc. Mov. Pal. ($\times 10^6$) ²	0.51	0.02*
Defeitos totais (%)	-0.3	0.221
MT (%)	0.24	0.343
MP (%)	0.18	0.469
RAP (%)	0.22	0.386
VCL (um/s)	-0.58	0.011*
VSL (um/s)	-0.24	0.346
VAP (um/s)	-0.46	0.055*
LIN (%)	0.36	0.142
STR (%)	0.12	0.642
ALH (um)	-0.44	0.065†
BCF (Hz)	-0.41	0.094†
PIAIA (%)	-0.03	0.921
PLALS (%)	0.05	0.841
IMP (%)	-0.17	0.51
IMA (%)	-0.32	0.194

APM (%)	0.09	0.711
Continuação		
MIAI (%)	0.33	0.184
Característica espermática	Coefficiente r	Valor de p
MAI (%)	0.48	0.043*
MI	0.32	0.196
MIHP (%)	-0.17	0.512
Ratio_H:L	0.22	0.405
MITOi (ua)	0.15	0.572
MITO_MI (%)	0.3	0.24
DHEi UA)	0.23	0.36
BODIPYi UA)	-0.16	0.537
DAF_MI (%)	0.1	0.885
DAFi UA)	0.57	0.014*
DHRi UA)	-0.19	0.452

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

Legenda: Motilidade total (MT), Motilidade progressiva (MP), Células rápidas (RAP), Velocidade curvilínea (VCL), Velocidade progressiva (VSL), Velocidade do trajeto (VAP), Linearidade (LIN), Retilinearidade (STR), Deslocamento lateral da cabeça (ALH), Frequência de batimentos da cauda (BCF), Porcentagem de células com integridade de membrana plasmática e acrossoma (MIAI), Integridade de membrana acrossomal (MAI), Integridade de membrana plasmática (MI), células com membrana íntegra e alto potencial mitocondrial (MIHP), Baixo potencial de membrana mitocondrial (LPM) e Alto potencial de membrana mitocondrial (HPM), Relação entre alto e baixo potencial de membrana mitocondrial (Ratio H:L), Intensidade de fluorescência da sonda Mitosox Red (MITO_i), porcentagem de células com integridade de membrana e espécies reativas de oxigênio mitocondriais (MITO_MI), Intensidade de fluorescência da sonda Dihidroetídium (DHEi), Intensidade de fluorescência da sonda C11-BODIPY (581/591), (BODIPYi), Intensidade de fluorescência da sonda 4,5-diaminofluoresceína-2/diacetato (DAFi), porcentagem de células com DAF positivo e membrana íntegra (DAF_MI), Intensidade de fluorescência da sonda Dihidrorodamina (DHRi).

† p≤0,09 †P<0,10 e *P<0,05. Indica significância pela correlação de Pearson

5.5 DISCUSSÃO

As partidas deste experimento são de animais elite, maduros e que foram selecionados para reprodução comercial na indústria de IA, e cujas partidas passam por um controle de qualidade seguindo os requerimentos mínimos para aprovação de partidas de sêmen. Mesmo sendo partidas aprovadas pela central, com características espermáticas dentro do padrão convencional, existiu diferença entre o resultado final da taxa de prenhez de este grupo de touros. Há bem relatado sobre as diferenças na fertilidade entre touros mesmo com características seminais “normais” (OLIVEIRA et al., 2013a; SANTOS, 2016), assim como, que os testes laboratoriais convencionais não são suficientes para determinar a fertilidade real, devido às inúmeras características envolvidas no processo de fertilidade. O método mais representativo para avaliar o potencial fecundante do sêmen é pelos resultados obtidos da

fertilidade *in vivo* após uma programa de IA ou de monta natural. No entanto, é difícil aplicar este método na rotina pelo custo e tempo requerido (AL NAIB et al., 2011; SUDANO et al., 2011; MORADO et al., 2015).

Estimativas do potencial de fertilidade tem sido difíceis, devido a que a fertilidade é um processo multifatorial e no que respeita ao macho, o sêmen deve possuir muitas características funcionais e estruturais que confirmam a habilidade para que o processo de fecundação aconteça (AMANN, 1989; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2006). Na amostra seminal deve existir uma população suficiente de espermatozoides possuindo certas características específicas como mínimo (FERRAZ et al., 2014). No entanto, como foi observado pela análise convencional, as partidas de sêmen dos touros de alta e baixa fertilidade apresentavam motilidade subjetiva, vigor, morfologia e concentração semelhantes, indicando que pelas técnicas convencionais, estas condições mínimas que o sêmen deve possuir não determinaram o potencial de fertilidade entre os grupos. A determinação da motilidade é geralmente considerada como uma das características mais importantes associadas com a capacidade de fertilização dos espermatozoides (NAGY et al., 2015).

Neste estudo, o cálculo da média da motilidade total do grupo de alta e baixa fertilidade pelo sistema CASA não foi informativo para explicar a diferença de fertilidade. No entanto, outras características de qualidade e velocidade do movimento como foi o VAP e o VCL indicaram que o grupo de menor fertilidade tinha uma população de espermatozoides mais velozes. A melhor velocidade sem qualidade do movimento pode indicar que os espermatozoides estão passando por um processo de hiperativação e seguidamente, os espermatozoides precapitados perdem seu potencial de fertilidade. Uma teoria sobre o movimento flagelar, indica que altas velocidades estimula a produção de ROS e o aumento de ROS pode levar a redução da viabilidade, assim, a restrição da motilidade incrementa a sobrevivência espermática (SCOTT; RAMIREZ-REVECO; PARODI, 2016). O ALH é uma característica espermática relacionada com menor potencial de fertilidade, sendo que o grupo de baixa fertilidade apresentava valores superiores que os encontrados no grupo de AF respectivamente ($3,4 \pm 0,27$ e $2,65 \pm 0,27$). Esta característica do movimento é relacionada igualmente com eventos da capacitação espermática. Portanto, o aumento do VAP, VCL e ALH poderiam ser considerados como critérios para identificar amostras seminais menos férteis. Que fazem parte de subpopulações velozes com movimento lateral aumentado, requerendo do aumento do metabolismo e maior gasto energético. Assim, a traves do uso do CASA foram detectadas algumas diferenças da fisiologia do movimento de espermatozoides de alta e baixa fertilidade.

Ao respeito, Amann e Waberski (2014) sugerem que a avaliação das características da motilidade espermática não pode estimar o potencial de fertilidade dos espermatozoides em uma determinada amostra que foi usada para IA. Das características do CASA mais informativas são a VCL e STR, com classificação em três grupos: (1) inmoteis, VCL próximo de zero; (2) indesejável com baixo VCL ou STR; E (3) satisfatório, VCL e STR dentro dos valores preconizados. Embora, nossos resultados mostraram que o STR foi similar entre os grupos de fertilidade e o VCL mais satisfatório foi o menor valor encontrado no grupo de AF ($145 \pm 6,57$) em comparação ao de baixa fertilidade ($170 \pm 6,57$). O uso de CASA fornece estimativas da função espermática através do estudo de várias características da motilidade, velocidade e tipo de movimento, que se correlacionam com o potencial de fertilidade do touro (FARRELL et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2013a; NAGY et al., 2015). O VAP apresenta alta correlação ($r = 0,70$; $p = 0,023$) com taxa de não retorno (NRR) aos 75 dias (NAGY et al., 2015).

Em touros Holstein foi encontrado que a fertilidade se correlaciona moderadamente com motilidade total ($r = 0,25$ $p = 0,0016$), STR ($r = 0,33$ $p < 0,0001$), LIN ($r = 0,28$ $p = 0,0006$) e % fragmentação do DNA ($r = -0,16$ $p = 0,04$), no entanto, as avaliações de integridade de membrana, acrossomal e peroxidação lipídica não mostraram relação com a fertilidade (GLIOZZI et al., 2017). A avaliação da motilidade espermática deve dar uma imagem global da qualidade do espermatozoide e deve estar de acordo com outras características espermáticas, tais como a integridade membranas (GIARETTA et al., 2017). Como demonstrado por Davila et al. (2015) a motilidade total pelo CASA foi correlacionada com integridade de membranas e atividade mitocondrial. Alguns características como o VAP, VSL e WOB mostraram uma correlação negativa significativa com a percentagem de espermatozoides com acrossoma intacto (GIARETTA et al., 2017). O efeito das características do CASA e da integridade de membranas e potencial de membrana mitocondrial sobre a fertilidade no sêmen de touro precisa ser aprofundada, dado que diferenças na taxa de prenhez (%) foram influenciadas pela qualidade do sêmen (OLIVEIRA et al., 2014). As análises laboratoriais atualmente utilizadas para avaliar o espermatozoide não se correlacionam consistentemente com a fertilidade dos espermatozoides (MOCÉ; GRAHAM, 2008). Essas inconsistências nos resultados ressaltam a importância da existência de valores de referência para as características avaliadas pelo CASA, que permitam interpretar os resultados para cada espécie (AMANN; WABERSKI, 2014).

De acordo com os resultados das análises utilizando sondas fluorescentes para leitura por microscopia de epifluorescência não foi possível encontrar diferenças entre a integridade

da membrana plasmática e o potencial de membrana mitocondrial entre grupos de alta e baixa fertilidade. A presença de estas populações PIAIA, MPI, APM foi semelhante entre grupos. Estas populações se encontram dentro da porcentagem normal já relatada por Celeghini et al., 2008. (2008) para sêmen de touros. Análises utilizando sondas fluorescentes por citometria de fluxo podem estimar a capacidade fertilizante do sêmen (MORADO et al., 2015; SELLEM et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2012). O FITC-PSA na avaliação da integridade da membrana acrossomal por citometria de fluxo é um bom preditor da taxa de concepção (OLIVEIRA et al. 2013, CELEGHINI et al. 2007).

No presente estudo foi encontrado que o grupo de AF apresentava menor porcentagem de espermatozoides com acrossoma integro (IMA). No entanto, na avaliação pela citometria de fluxo foi possível comprovar que o grupo de alta fertilidade tinha valores superiores ($80,74 \pm 3,60$) de integridade de membrana acrossomal (MAI) que o grupo de baixa fertilidade ($74,31 \pm 3,60$). O uso da citometria de fluxo deu maior acurácia ao uso de sondas fluorescentes para detecção do potencial de fertilidade.

Coincidindo com Gliozzi et al. (2017) e Sellem et al. (2015), a população de espermatozoides com membrana integra e acrossoma integro e com alto potencial de membrana mitocondrial não foram diferentes para partidas de sêmen de alta e baixa fertilidade.

Dos resultados da análise de usando sondas fluorescentes para análises simultâneas de membranas, produção de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica também não mostraram diferenças entre grupos de alta e baixa fertilidade.

Gliozzi et al. (2017) usando o test de vivos e mortos (LIVE-DEAD® Sperm Viability Kit (Life Technologies Italia, Monza, Italy) encontrou que a membrana plasmática é mais resistente a os danos efeitos da congelção em touros de alta fertilidade. Em touros de baixa fertilidade a criopreservação espermática pode reduz a tolerância para o estresse oxidativo, causando também diminuição da atividade de enzimas antioxidantes e levando a maior danos na membrana plasmática. Diferindo dos achados do presente experimento, onde nem pela microscopia de epifluorescência nem pela citometria de fluorescência foi detectada diferenças entre grupos de fertilidade.

No presente estudo foram realizadas diferentes técnicas de avaliação mitocondrial. Desde o principal método de avaliação do potencial de membrana mitocondrial até diferentes técnicas de avaliação de biomarcadores da função mitocondrial. Existem biomarcadores mitocondriais que são importantes indicadores de sua função. Por exemplo, a produção de energia pela síntese de ATP na mitocôndria requer potencial de membrana mitocondrial, este

potencial também é requerido para a homeostase do cálcio e apoptose; portanto, o potencial mitocondrial é o principal biomarcador mitocondrial (ZHANG et al., 2017). Os marcadores mitocondriais avaliam a atividade mitocondrial e especificamente a modulação dos mecanismos oxidativos. Em um estudo foi determinada a influência do desafio oxidativo no desenvolvimento embrionário *in vitro*, determinando que o efeito varia dependendo da intensidade do desafio oxidativo (CASTRO et al., 2016). A análise dos biomarcadores mitocondriais mostrou que o metabolismo da mitocôndria grupos de alta e baixa fertilidade foi semelhante e não foram de valor preditivo para fertilidade *neste* grupo de partidas. Apesar que Sousa et al. (2011) relatou que o funcionamento mitocondrial é crucial para os espermatozoides, sendo altamente relacionado com altas taxas de funcionalidade e fertilidade da célula espermática. A função mitocondrial é essencial para a capacitação espermática, isso envolve a fosforilação de proteína tirosina, a diminuição da síntese do glutamato peroxidase e ATP sintase subunidade beta reduz a fertilidade do sêmen (SHAHANI et al., 2010). Esta organela também é responsável pela maior parte da produção endógena de espécies reativas ao oxigênio (ROS) como biometabólitos (CÂMARA; GUERRA, 2008). Alguns estudos tinham mostrado valor preditivo da avaliação da mitocôndria espermática e do estado energético dos espermatozoides com fertilidade. O funcionamento mitocondrial é altamente relacionado com altas taxas de funcionalidade e fertilidade da célula espermática, dessa forma, a avaliação criteriosa da função mitocondrial surge como ferramenta para o sucesso na seleção de animais de interesse reprodutivo (ANGRIMANI et al., 2015).

A produção de espécies reativas mitocondriais e citoplasmáticas foi quantificada, devido a que níveis baixos de ROS são necessários para as funções normais de espermatozoides como capacitação, hiperativação, motilidade, reação acrosômica, fusão ao oócito e fertilização (VENKATESH et al., 2009). No entanto, só numericamente parecia que o grupo de maior fertilidade tinha maior produção de ROS, sem diferença estatística com o grupo de baixa fertilidade.

No presente estudo, o resultado da fertilidade de 3 touros (3 partidas) são baseados no resultado dos dados provenientes da recopilação de 29.939 IA em 286 rebanhos que determinou os touros de alta fertilidade (TP%=54,3±1,0) e de 3.259 IA em 23 rebanhos que determinou os touros de baixa fertilidade (TP%=41,5±2,3). A diferença entre touros foi significativa (P<0,05). As análises espermáticas *in vitro* foram associadas com a taxa de prenhez, obtendo altas correlações na motilidade subjetiva (r=0,62; P=0,006), com concentração de espermatozoides moveis por palheta (x10⁶) (r=0,51; P=0,02) e com vigor (r=0,44; P=0,06). Mostrando que as análises convencionais estão associadas ao potencial de

fertilidade, mas não se sabe se a fertilidade a campo poderia realmente ser prevista por essas características.

Segundo Nagy et al. (2015) as análises do CASA das características da motilidade, velocidade e qualidade do movimento, fornece informações mais valiosas sobre os características fisiológicos do estado dos espermatozoides e estão altamente associados com taxa de não retorno à os 30 dias (NRR30). Este autor encontrou altas e positivas correlações para a VAP ($r=0.66$; $P=0.035$), VSL ($r=0.66$; $P=0.035$), VCL ($r=0.70$; $P=0.023$). Os nossos resultados foram contraditórios aos de Nagy et al. (2015). As características do movimento espermático que apresentaram correlação negativa com fertilidade foram o VCL ($r=-0.58$; $P=0.01$), VAP ($r=-0.46$; $P=0.05$), ALH ($r=-0.44$; $P=0.06$), BCF ($r=-0.41$; $P=0.09$). A motilidade total ($r=0.24$; $P=0.34$) e LIN ($r=0.36$; $P=0.14$) tiveram baixa e positiva correlação, mas não alcanço a significância. De fato as características do sêmen influenciam no resultado final da fertilidade, existindo correlação com fertilidade *in vivo* (TARTAGLIONE; RITTA, 2004; SUDANO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013b).

Outras características que mostraram associação com fertilidade foram a integridade acrossomal ($r=0.48$; $P=0.043$), sua avaliação foi feita usando a citometria de fluxo, sendo estas duas características importantes preditores de fertilidade. A integridade do acrossoma já foi relatada como um marcador de fertilidade (CELEGHINI et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2013b; SELLEM et al., 2015). Pelo contrário Gliozzi et al. (2017) não observaram correlação entre a avaliação do acrossoma e a fertilidade. Esses autores também observaram diferenças limitadas entre grupos de alta e baixa fertilidade, eles atribuem seus resultados à faixa estreita de fertilidade entre touros, embora todos os touros tenham sido escolhidos nos extremos da fertilidade pela curva de distribuição.

Em programas reprodutivos onde é usada a inseminação artificial e IATF o uso de sêmen de alta qualidade é fundamental para o sucesso reprodutivo. Então, análises mais objetivas complementam a análise do sêmen e tem maior eficiência na detecção de sêmen com melhor qualidade, quando eventualmente alguma alteração da estrutura ou função espermática não seja detectada pelas análises convencionais.

A capacidade de fecundação envolve mais fatores que aqueles avaliados pela análise convencional. Podem ser fatores relacionados com a fêmea, a nutrição, o meio ambiente, o clima, ou com o manejo do programa de reprodução, protocolos, a técnica de inseminação, o inseminador, o descongelamento do sêmen (SÁ FILHO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2012, 2013b). Um fator que pode estar influenciando a fertilidade é o fato que a fertilidade de

touros varia de 0,5 e 2,5% entre vacas inseminadas com e sem sincronização, sugerindo que a sincronização hormonal reduz a fertilidade dos touros (ABDEL-AZIM, 2010).

No presente estudo também foram associadas a produção de NO e a fertilidade, sendo alta a correlação encontrada ($r=0,57$; $P=0,01$). A literatura reporta que o NO é essencial para a função espermática (LAMPAIO et al., 2014, NISOLI et al., 2006), regula muitos processos mas as vezes é paradoxal sua função (LAMPAIO et al., 2014). Em níveis fisiológicos, o NO participa da capacitação espermática, reação acrossomal e efeito antiapoptótico (WANG et al., 2014, ROESSNER et al., 2010). Coincidindo também com Franco (2013), que relatou em espermatozoides de equino que o NO pode funcionar como um captador de radicais livres e inativar o $O_2^{\bullet-}$, mas o excesso pode resultar na geração de ONOO-, um oxidante potente que se descompõe para formar o radical hidroxila (HOONO), que pode causar a peroxidação lipídica por nitrosação. A produção de $O_2^{\bullet-}$ e de peroxinitritos, assim como a peroxidação lipídica mostraram valores semelhantes em grupos de alta e baixa fertilidade. Mas o grupo de alta fertilidade teve maior produção de NO controlando a produção de espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio. Demonstrando que o impacto positivo do NO resultados de taxa de prenhez *in vivo*.

5.6 CONCLUSÕES

Foi determinado que existe um baixo impacto sobre a fertilidade de amostras de sêmen de alta e baixa fertilidade espermatozoide, devido a que o espermatozoide é uma célula altamente complexa.

Analises multiparamétricas abordando o estudo de características espermáticas por métodos mais sensíveis de avaliação seminal como as sondas fluorescentes por citometria de fluxo devem ser aplicados para o diagnóstico da qualidade espermática e predição do potencial de fertilidade.

A análise convencional, o CASA e citometria de fluxo são excelentes ferramentas de diagnóstico para monitorar a qualidade do sêmen quando associadas. Que pode ser usado no controle de qualidade e predição do potencial de fertilidade de amostras de sêmen.

No entanto, sugere-se, que os touros apresentam diferença nas características espermáticas mesmo apresentando níveis de fertilidade semelhantes e deve ser identificado

em cada touro e em cada partida quais são as características que estão influenciando mais na fertilidade individualmente.

6 ARTIGO 3. RELAÇÃO ENTRE AS CARACTERÍSTICAS DE QUALIDADE ESPERMÁTICA DE PARTIDAS DE SÊMEN BOVINO E A FERTILIDADE *IN VIVO*: CONTRIBUIÇÃO DOS MARCADORES MITOCONDRIAIS

6.1 INTRODUÇÃO

O mercado da IATF no Brasil ganha cada vez mais espaço nos programas de reprodução animal e o uso exclusivo de sêmen congelado incrementa a demanda de sêmen. Com o propósito de aumentar a eficiência reprodutiva de um programa de IATF, um dos fatores chaves é o uso de sêmen de alta qualidade com capacidade fecundante. As técnicas convencionais de análise seminal *in vitro* falham na predição do potencial de fertilidade de uma partida de sêmen usada a campo (SANTOS, 2016a). As técnicas mais objetivas como o CASA, não conseguem detectar diferenças entre touros de baixa ou média fertilidade (VINCENT et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2014b). Muitos outros testes de avaliação seminal têm sido desenvolvidos para determinar o potencial de fertilidade de uma maneira mais acurada e objetiva.

A relação entre qualidade do sêmen de touros com a fertilidade a campo, seja por resultado da taxa de prenhez, ou pela taxa de não retorno ao estro (NRR), tem sido foco de muitas pesquisas (CHRISTENSEN et al., 2005; VINCENT et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2014b; SELLEM et al., 2015, SANTOS, 2016a). Entretanto, os resultados são controversos. As técnicas convencionais analisam um atributo espermático por vez, são subjetivas e o resultado varia entre técnicos. Para contornar este problema surgiram técnicas objetivas mediante o uso de sondas fluorescentes para o estudo de várias estruturas espermáticas ao mesmo tempo (CELEGHINI et al., 2008) e técnicas de utilizando sistema computadorizado de análise da motilidade. Dada a complexidade do processo de fecundação e os requerimentos que deve apresentar uma amostra de sêmen para levar com sucesso este processo, a associação de vários testes *in vitro* para avaliar qualidade seminal seria mais apropriada para tirar uma conclusão válida (KUISMA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2012; SHALOM-PAZ et al., 2014; SELLEM et al., 2015). Resultados com sêmen humano apontam a mitocôndria como um indicador apropriado de melhor qualidade espermática e associado intimamente com habilidade de fecundação, pois notou-se que maior percentual da população

de espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial poderia estar associada a melhora do potencial de fertilidade (SOUSA et al., 2011; AMARAL et al., 2013).

Com a inovação contínua, a citometria de fluxo (FC) está sendo cada vez mais aplicada no diagnóstico rotineiro andrológico (FATHI et al., 2011) e permite avaliar simultaneamente uma população de milhões de espermatozoides de uma partida de sêmen em minutos (PEÑA, 2015). A citometria de fluxo possibilita a determinação mais objetiva e profunda da qualidade espermática (CHRISTENSEN et al., 2005; BATTUT, 2016; MALAMA et al., 2017). Portanto, a seleção de partidas de sêmen baseada no método de citometria de fluxo permitiria uma predição da qualidade seminal que melhoraria os resultados da taxa de prenhez a campo.

Tentando resolver a dúvida sobre quais são as características seminais que devem possuir uma amostra com alto potencial fecundante foram estudados os aspectos funcionais e estruturais do espermatozoide, aplicando a citometria de fluxo para o estudo de diferentes organelas espermáticas, dando-se destaque à avaliação de marcadores mitocondriais e processos fisiológicos associados com sua função como é o estresse oxidativo.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

A condução do presente estudo está de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (aprovado no protocolo CEUA-FMVZ nº 3649100616).

6.2.1 Local e período experimental

O presente experimento foi realizado entre agosto de 2014 e maio de 2016 no Laboratório de Andrologia e Tecnologia de Embriões Suínos (LATES), no Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia (LBSA) do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia e no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD) do

Departamento de Ciências básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, pertencentes à Universidade de São Paulo, Campus “Fernando Costa”, Pirassununga, SP.

6.2.2 Touros e Partidas de sêmen

Foram recebidas 29 partidas de sêmen, provenientes de 7 touros das raças Nelore e 4 Angus, com idade entre 2 e 14 anos, pertencentes a três centrais de reprodução diferentes, foram coletados, avaliados e processados para criopreservação na respectiva central. Quatro palhetas de cada partida foram doadas para este estudo. Estas palhetas foram armazenadas em botijões de nitrogênio líquido (-196°C) e mantidas no laboratório até as análises.

6.2.3 Critérios para seleção do sêmen usado na IATF

Somente as partidas consideradas aprovadas, seguindo as recomendações estabelecidas pelo CBRA (2013), foram utilizadas no programa de IATF. Toda as partidas tinham volume $\geq 0,25$ mL; motilidade progressiva $\geq 30\%$; vigor ≥ 3 , número de espermatozoides móveis/palheta $\geq 10 \times 10^6$, espermatozoides normais $\geq 70\%$, defeitos maiores $\leq 20\%$ e defeitos menores $\leq 30\%$. Para isto, duas palhetas de cada partida foram descongeladas em banho-Maria a 37°C durante 30 segundos, o sêmen foi depositado em microtubos (1,5 mL) pré-aquecidos a 37°C , homogeneizado e mantido em banho-Maria seco na temperatura de 37°C durante as análises. Foram realizadas as avaliações convencionais: motilidade subjetiva do sêmen (%), vigor (1 – 5), concentração por câmara de Neubauer (espermatozoides/palheta) e morfologia espermática (%) por microscopia de contraste de interferência diferencial.

6.2.4 Animais e protocolo para inseminação artificial em tempo fixo (IATF)

Um grupo de vacas da raça Nelore ($n=4.795$), sendo pluríparas ($n=4.597$), primíparas ($n=112$) e solteiras ($n=86$), com idade entre 4 e 10 anos e escore de condição corporal (ECC)

entre 2 – 5, seguindo uma classificação de 1 a 5, foram incluídas em um programa de IATF. Os animais foram mantidos em pasto composto por *Brachiaria brizantha* ou *Brachiaria decumbens*, suplementados com sal mineral e livre acesso à água, separadas em diferentes lotes em cinco fazendas comerciais de gado de corte no Estado do Mato Grosso do Sul e na cidade de Puerto Suárez (Bolívia) e na fazenda localizada no Estado do Paraná. A IATF foi realizada durante a estação de monta de 2014 a 2015.

As vacas foram sincronizadas utilizando o mesmo protocolo de tratamento hormonal de três manejos. No dia “0” todas as vacas receberam dispositivo intravaginal contendo progesterona (Sincrogest, Ourofino, Cravinhos, SP, Brasil), e uma aplicação de 2 mg de Benzoato de estradiol (BE, Sincrodiol, Ourofino). Após 8 dias foram removidos das vacas os dispositivos intravaginais e seguidamente administrado via IM 1 mg de Cipionato de estradiol (ECP, Zoetis, São Paulo, Brasil), 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG, Folligon®, Intervet-Schering Plough) e 0,530 mg de Cloprostenol sódico (Sincrocio®, Ourofino); 48 horas após, as vacas foram submetidas à IATF (Figura 12).

A IA foi realizada por inseminadores treinados da própria fazenda. Foram usadas as partidas de sêmen aprovadas pelas análises convencionais. A inseminação foi aleatória, em diferentes fazendas e lotes de inseminação.

Figura 12 – Representação gráfica do protocolo de sincronização das vacas Nelore e momento da inseminação artificial em tempo fixo (IATF)

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

Legenda: Benzoato de estradiol (BE), Prostaglandina F2 alfa (PGF2α), Cipionato de estradiol (ECP), Gonadotrofina coriônica equina (eCG), Dias 0, 8 e 10 (D0, D8 e D10)

6.2.5 Diagnóstico de gestação

Todas as vacas foram examinadas por ultrassonografia transretal para diagnóstico de gestação aos 30 a 45 dias após a IATF, utilizando-se o aparelho da marca Aloka SSD 500 com probe linear de 5 mHz, modo B. Foi considerado como prenhez positiva quando observada a vesícula embrionária, somado à presença de batimento cardíaco que indica um embrião viável.

A taxa de prenhez (TP%) foi definida como o número de fêmeas gestantes aos 30 dias após a IATF, divididas pelo número total de fêmeas inseminadas artificialmente. Para cada partida aprovada para uso na IATF, a fertilidade foi determinada de acordo com o número de diagnósticos positivos dividido pelo valor do número de IA por 100%.

6.2.6 Análises laboratoriais do sêmen

Duas palhetas de cada partida que estavam armazenadas no nitrogênio líquido, foram descongeladas a 37°C por 30 segundos em banho-Maria e depositadas em um microtubo de 1,5mL e imediatamente foram realizadas as análises convencionais (Motilidade subjetiva, vigor, concentração e morfologia espermática). O sêmen foi diluído com TALP como descrito por Celeghini et al. (2007), na concentração de 25×10^6 espermatozoides/mL e mantido em banho-Maria seco (37°C) para realizar as análises seguidamente à diluição.

6.2.6.1 Cinética espermática avaliada por CASA

As características da motilidade espermática foram avaliadas utilizando o sistema computadorizado *Sperm Class Analyzer* (SCA®, CASA System, Microptic), previamente ajustado o setup para sêmen de bovino (Apêndice A). Imediatamente após a diluição no TALP, foram depositados 10 µL da amostra em uma câmara de leitura padrão (Makler câmara de contagem, SEFI Medical Instruments LTD, Haifa Israel) previamente aquecida a 37°C. Foram avaliados no mínimo 5 campos, evitando os campos com artefatos. Os seguintes características da motilidade espermática foram escolhidos para as análises: motilidade total

(MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude lateral da cabeça (ALH, μm), frequência de batimento (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %), linearidade (LIN, %), células com velocidade rápida (RAPID, %).

6.2.6.2 Análise da membrana plasmática, acrossoma e potencial de membrana mitocondrial

Foi realizada a análise simultânea da integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial utilizando sondas fluorescentes (PI, Hoescht 33342, JC-1, FITC-PSA) e leitura pela microscopia de epifluorescência, como descrito por Celeghini et al., 2007. Resumidamente, uma amostra de 150 μL do sêmen diluído em meio TALP a 25×10^6 espermatozoides/mL, foi incubada com as sondas fluorescentes: 2 μL de Hoescht 33342 (H342, 2,5 mg/mL, Molecular Probes), 3 μL de Iodeto de propídio (PI, 0,5 mg/mL, Sigma-Aldrich), 50 μL de Aglutinina de *Pisum sativum* conjugada com isotiocionato de fluoresceína (FITC-PSA, 100 $\mu\text{g/mL}$, Sigma-Aldrich) e 6 μL de iodeto de 5,5',6,6'tetracloro 1,1',3,3'tetraetilbenzimidazolil carbocianina (JC-1, 153 μM , Sigma-Aldrich). A leitura foi realizada sob microscopia de epifluorescência (modelo 80i, Nikon Tóquio, Japão) em aumento de 1.000 x, utilizando-se o filtro triplo (D/F/R, C58420) apresentando os conjuntos UV-2E/C (excitação 340-380 nm e emissão 435-485 nm), B-2E/C (excitação 465-495 nm e emissão 515-555 nm) e G-2E/C (excitação 540-525 nm e emissão 605-655 nm). Para as análises foram usados os resultados do percentual de células PIAIA, membrana plasmática íntegra (MPI), acrossoma íntegro (MAI) e alto potencial de membrana mitocondrial (APM).

6.2.6.3 Análises seminais por citometria de fluxo

As sondas foram provenientes da empresa Molecular Probes e Sigma-Aldrich. Todas as análises foram realizadas no citômetro de fluxo BD Acurri™ (BD Biosciences, São José, CA, EUA). Duas palhetas de sêmen (0,25 mL), foram descongeladas e mantidas a 37°C em banho-Maria. Seguidamente diluídas na concentração de 5×10^6 espermatozoides/mL em meio

TALP (15 mL). Após finalizado o tempo de incubação respectivo de cada protocolo, a amostra de sêmen foi diluída com TALP para obter uma concentração de $2,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL para a leitura no citômetro. Na leitura, as partículas com tamanho e complexidade interna semelhantes aos espermatozoides foram selecionadas através do *Dot-plot* de Forward scatter e Side scatter. Em seguida, utilizou-se a sonda SYTO-59[®] (750mM, Molecular probes-S1134), que teve como objetivo, evitar que houvesse a contagem de forma equivocada de partículas com o mesmo tamanho e granulosidade do espermatozoide (ANDRADE, 2009), posteriormente é posicionado um Gate sobre a população de espermatozoides e analisados unicamente os espermatozoides.

6.2.6.3.1 Avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal

Uma alíquota de 150 μ L de sêmen diluído em TALP na concentração de 5×10^6 espermatozoides/mL, foram depositados em um microtubo e adicionou-se 2 μ L de SYTO-59[®] (750 mM, Molecular probes, S1134), 1 μ L de PI (0,5 mg/mL, Sigma-Aldrich, P4170), 1 μ L de Lecitina obtida de *Arachis hypogaea* (PNA), conjugada com FITC (37,5 μ g/mL, Sigma-Aldrich, L7381), que foram incubadas durante 10 minutos a 37°C (ANDRADE, 2009). Após a incubação a amostra foi diluída novamente para alcançar uma concentração de $2,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL com adição de TALP. Estas sondas são utilizadas com o objetivo de corar as células com membrana plasmática lesada (PI positivo) (CELEGHINI et al., 2007; ANDRADE et al., 2007) e com a membrana acrossomal reagida (FITC-PNA positivo). O FITC-PNA com excitação/emissão de 495 nm/525 nm foi excitado pelo laser azul (488 nm) e detectado pelo FL1, o PI com excitação/emissão de 533 nm/617 nm, foi excitado pelo laser vermelho (635nm) e detectado pelo FL3 e o SYTO-59[®] com excitação/emissão de 622 nm/645 nm, foi excitado pelo laser vermelho (635 nm) e detectado pelo FL4. A população de interesse é a porcentagem de espermatozoides com integridade de membrana plasmática e acrossomal (MAI), e o total de espermatozoides com membrana íntegra (AIM).

6.2.6.3.2 Avaliação do potencial de membrana mitocondrial

Seguindo a técnica desenvolvida por Andrade (2009), uma alíquota de 150 μL sêmen (5×10^6 espermatozoides/mL) foi depositada em um microtubo, e adicionados a seguir, 1 μL de JC-1, 1 μL de PI e 2 μL de SYTO-59, incubados por 10 min. a 37°C e, em seguida, diluídas com 150 μL de TALP para se obter uma concentração de $2,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL. O JC-1 foi excitado com laser azul de 488 nm, a detecção dos J-agregados (cor vermelho alaranjado) foi feita no FL2-A (580 nm), enquanto que, os monômeros (cor verde) foram lidos no FL1-A (530 nm). A detecção do PI foi feita no FL3. Considerou-se a população de espermatozoides com Membrana íntegra e alto potencial mitocondrial (MIHP). A avaliação qualitativa do potencial de membrana mitocondrial foi realizada mediante a detecção da taxa de despolarização da mitocôndria ou perda do potencial ($\Delta\psi\text{m}$), visualizada no gráfico de *Dot-plot* do quadrante 2, a porcentagem de células no FL2 observadas no quadrante UR (Q2-UR) foi dividida pela porcentagem de células no FL1 observadas no quadrante UL (Q2-UL), o valor resultante é um indicador da relação entre o alto potencial e o baixo potencial (Relação H:L).

6.2.6.3.3 Produção de ânion superóxido pela mitocôndria espermática

Uma modificação da técnica descrita por Gürler (2015) para sêmen de bovino, foi utilizada para estimar a quantidade de $\text{O}_2 \cdot^-$ produzido pela mitocôndria. Uma alíquota de 150 μL da amostra de sêmen diluída no TALP (5×10^6 espermatozoides/mL) foi depositada em um microtubo e adicionados 1,5 μL de Mitosox Red (MSR, 2 μM , M36008, Molecular Probes) e incubados durante 30 minutos a 37°C . Depois de 10 minutos da adição do MSR foi adicionado 1 μL de YOPRO-1 (7,5 μM , Y3603, Thermo Fisher) e 10 minutos depois foi adicionado 1,5 μL de SYTO-59[®] (750 mM, Molecular Probes, S1134). Cumpridos os 30 minutos da incubação, foram adicionados outros 150 μL de TALP para deixar a amostra na concentração de $2,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL. A excitação da fluorescência do MSR (vermelho) foi conseguida com o laser azul (488 nm) e a detecção usando o FL2-A (585/40 nm). O YOPRO-1 foi excitado pelo laser azul (488nm) e detectado no FL1-A (533/30 nm). O SYTO-59[®] foi excitado pelo laser vermelho (635nm) com excitação/emissão de 622 nm/645

nm e foi detectado pelo FL4 (675/25 nm). Os resultados foram expressos como a percentagem de células viáveis coradas positivamente com MSR (MITO_MI), assim como os valores absolutos da mediana (ua) da intensidade de fluorescência (MITOi).

6.2.6.3.4 Presença de espécies reativas de oxigênio citoplasmática

Para a detecção de espécies reativas citoplasmáticas foi usado o Dihidroetidium® (DHE, 360 µM, D1168-Thermo Fisher), com afinidade principalmente para o ânion superóxido citoplasmático. Uma alíquota de 150 µL de sêmen diluído no TALP contendo 5×10^6 espermatozoides/mL foi depositada em um microtubo e adicionados 1 µL o DHE, dez minutos depois foi adicionado 1 µL de YOPRO-1 (7,5 µM, Y3603, Thermo Fisher) e dez minutos depois 2 µL de SYTO-59®. Aproximadamente 10.000 eventos foram analisados por amostra. O laser azul (488 nM) foi utilizado para excitar o DHE e detectado pelo FL2-A, o YOPRO-1 pode ser detectado pelo FL1-A. Os resultados foram obtidos a partir do histograma (Figura 3C), mostrando os espermatozoides vivos positivos para DHE. O valor usado se refere à mediana da intensidade de fluorescência (DHEi), dessa porcentagem de espermatozoides positivos.

6.2.6.3.5 Avaliação da peroxidação lipídica

Em uma alíquota de 150 µL de sêmen (5×10^6 espermatozoides/mL) foi adicionado 1 µL da sonda C11-BODIPY^{581/591} (2 mM, D-3861, Thermo Fisher Inc., Eugene, Oregon, EUA) e incubada por 30 minutos a 37°C. Passados 20 minutos do tempo inicial, foi adicionado 1 µL de PI (0,5 mg/mL, Sigma-Aldrich, P4170) junto com 2 µL de SYTO-59® (750 mM, Molecular probes-S1134). No fim dos 30 minutos de incubação foram adicionados 150 µL de TALP para deixar a amostra na concentração de $2,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL.

O BODIPY^{581/591} foi excitado pelo laser 488 nm, o FL1-A foi utilizado para medir a fluorescência verde, ou seja, com elevada peroxidação lipídica. O FL3-A para detectar a fluorescência do PI, separando os espermatozoides com membrana lesada e retirando da análise da peroxidação. O SYTO-59® com excitação/emissão de 622/645 nm, foi excitado

pelo laser vermelho (635nm) e detectado pelo FL4 para separação da população de espermatozoides dos debris. O valor absoluto da mediana da intensidade de fluorescência detectada pelo FL1 indica a quantidade de peroxidação lipídica dos espermatozoides vivos por amostra (BODIPYi).

6.2.6.3.6 Detecção de peroxinitrito (ONOO⁻) e derivados

Utilizou-se a sonda Dihidrorodamina (DHR, 40 mM, D1054 –Sigma Aldrich) para determinar as espécies reativas ao nitrogênio: peroxinitrito (ONOO⁻), radicais nitrogendioxido (NO₂[•]) e peroxidasas como descrito por Gürler (2015). A técnica foi adaptada, resumidamente, em uma alíquota de 150 µL sêmen foi diluído em TALP contendo 5×10⁶ espermatozoides/mL foi adicionado 3 µL DHR (40 mM, D1054 –Sigma Aldrich), 2 µL de SYTO-59[®] (750 mM, Thermo Fisher-S1134) e 3 µL de Iodeto de propídio (0,5 mg/mL, Sigma-Aldrich, P4170). Foram incubadas a 37°C no escuro por 30 min. Aproximadamente 10.000 eventos foram analisados por amostra. A Dihidrorodamina mostra uma fluorescência verde e pode ser excitada utilizando o Laser 488 nm. O FL1-A foi utilizado para a detecção do DHR (fluorescência verde). O PI com excitação/emissão de 533/617 nm foi excitado pelo laser vermelho (635 nm) e detectado pelo FL3-A e o SYTO-59[®] com excitação/emissão de 622/645 nm, foi excitado pelo laser vermelho (635 nm) e detectado pelo FL4. Foi utilizado o valor absoluto da mediana da intensidade de fluorescência do DHR positivo (DHRi).

6.2.6.3.7 Detecção do Óxido Nítrico

O NO intracelular foi medido usando a sonda 4,5-diaminofluorescein-2/diacetate (DAF-2/DA, 10 µM, Calbiochem, San Diego, Califórnia, EUA)) descrita por LAMPAIO, STRIJDOM, PLESSIS. (2006). Alíquotas de 150 µL de sêmen diluído em TALP (5 x 10⁶ espermatozoides/mL) foram adicionados 1 µL da sonda DAF-2/DA e incubados a 37 °C/20 min. Após a incubação 1 µL de PI (0,5 mg/mL) e 1,5 µL de SYTO 59[®] (750 mM) foram adicionados e incubados por mais 10 min a 37°C. Em seguida, a amostra foi analisada por

citometria de fluxo e as células viáveis (PI negativa) marcadas com a DAF-2/DA foram avaliadas quanto ao valor absoluto da mediana da intensidade de fluorescência captada.

A DAF-2/DA é excitada utilizando o Laser 488 nm. O FL1-A foi utilizado para a detecção da intensidade positiva (fluorescência verde). O PI com excitação/emissão de 533/617 nm foi excitado pelo laser vermelho (635nm) e detectado pelo FL3-A e o SYTO-59[®] com excitação/emissão de 622/645 nm, foi excitado pelo laser vermelho (635 nm) e detectado pelo FL4. As células integras (PI-) e analisadas, utilizado o valor de fluorescência (DAFi), assim espermatozoides com membrana plasmática íntegra e positivos para DAF2-DA (DAF_MI), O valor obtido é indicado como a mediana em unidades arbitrárias (ua).

6.3 DIAGRAMA DA SEQUENCIA EXPERIMENTAL

6.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados de porcentagem de prenhez do experimento I foram separados em três grupos: Alta fertilidade: TP $\geq 60\%$, fertilidade média (M): TP entre 53 – 59% e baixa fertilidade (B): com TP $\leq 52\%$. Assim, para avaliar o comportamento das análises convencionais, CASA, sondas fluorescentes por microscopia de epifluorescência avaliando a integridade de membranas plasmática, acrossomal, função mitocondrial e uso de sondas fluorescentes pela citometria de fluxo frente as classes de fertilidades determinadas, foi utilizado o procedimento PROC MIXED o programa SAS (versão 9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). Todas as variáveis estudadas em caso de efeitos significativos foi utilizado o Teste de Tukey como procedimento de comparações múltiplas. Os resultados são apresentados com estimativas de médias e erros padrão.

Para avaliação da fertilidade observada *in vivo* (taxa de prenhez) em função dos quartis observados para todas as variáveis já mencionadas, foi utilizado o procedimento PROC GLIMMIX do programa SAS, sob a metodologia dos modelos lineares generalizado, considerando a variável com distribuição binomial e função de ligação logística. Todos os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo que, em presença de efeito significativo, os dados foram avaliados pelo teste de Tukey considerando um nível de significância de 5%. Quando os dados foram estatisticamente significativos a nível de 10% se determinou como tendência estatística.

Adicionalmente foi realizada uma correlação de Spearman para verificar relações entre as variáveis estudadas usando o programa estatístico R (R versão 3.3.1 (2016-06-21)).

6.5 RESULTADOS

6.5.1 Estatística descritiva

Das 29 partidas de sêmen analisadas, 7 partidas (24,13%) foram de AF, 12 partidas (41,37%) foram de MF e 10 partidas (34,48%) foram de M (Tabela 25).

Tabela 25 – Relação das partidas classificadas nos três grupos de fertilidade: Alta (A), Média (M) e Baixa (B), segundo o resultado da taxa de prenhez (TP, %) na IATF por partida e a média $\pm$ erro padrão (EP)

Ordem	Touro	Partida	IA	DG+	Taxa de Prenhez (%)	Grupo	Média da TP ($\pm$ EP) (%)
1	S	S01	18	5	27,8	B	45,6 ($\pm$ 8,47) ^c Mínima: 27,8% Máxima: 52,6% IA: 1498
2	R	R01	9	3	33,3	B	
3	K	K01	33	15	45,5	B	
4	S	S02	85	39	45,9	B	
5	S	S03	255	121	47,5	B	
6	J	J01	163	80	49,1	B	
7	B	B01	514	265	51,6	B	
8	Q	Q01	115	60	52,0	B	
9	K	K02	268	140	52,2	B	
10	K	K03	38	20	52,6	B	
11	N	N01	150	81	54,0	M	56,25 ($\pm$ 1,91) ^b Mínima: 54,0% Máxima: 59,0% IA:3297
12	A	A01	439	237	54,0	M	
13	N	N02	59	32	54,2	M	
14	N	N03	162	89	54,9	M	
15	K	K04	29	16	55,2	M	
16	N	N04	76	42	55,3	M	
17	A	A02	181	103	57,0	M	
18	M	M01	100	58	58,0	M	
19	N	N06	363	211	58,1	M	
20	K	K05	199	116	58,3	M	
21	J	J02	289	169	58,5	M	
22	A	A03	144	85	59,0	M	
23	D	D01	139	85	61,0	A	65,6 ($\pm$ 3,82) ^a Mínima: 61,0% Máxima: 71,0% IA: 1106
24	D	D02	117	73	62,0	A	
25	S	S04	19	12	63,16	A	
26	A	A04	451	294	65,2	A	
27	A	A05	200	136	68,0	A	
28	D	D03	104	72	69,0	A	
29	D	D04	76	54	71,0	A	

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

^{ab} Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$) no teste de Tukey.

Foram determinadas as características espermáticas avaliadas pela análise convencional de acordo com o nível de fertilidade (Tabela 26), mostrando que não houve diferença entre grupos ($P>0,05$). As características da motilidade espermática avaliadas pelo CASA foram semelhantes entre grupos (Tabela 27) e para as características de membranas espermáticas avaliadas por sondas fluorescentes por microscopia de epifluorescência também não foram detectadas diferenças (Tabela 28).

Tabela 26 – Média ($\pm$ Erro padrão) das características espermáticas avaliadas por técnicas convencionais nos grupos de fertilidade: Alta (A), Média (M) e Baixa (B)

Características espermáticas	Fertilidade do Sêmen			Valor de P
	A	M	B	
Motilidade subjetiva (%)	62,30 ($\pm$ 4,99)	64,87 ($\pm$ 4,05)	60,90 ($\pm$ 3,95)	0,7249
Vigor (Escore 1-5)	2,89 ($\pm$ 0,26)	3,05 ($\pm$ 0,21)	2,69 ($\pm$ 0,21)	0,4255
Conc. Palheta ¹ ($\times 10^6$)	23,80 ($\pm$ 3,54)	14,99 ($\pm$ 2,89)	21,06 ($\pm$ 2,8)	0,0961
Conc. Mov. Pal. ² ($\times 10^6$)	15,09 ($\pm$ 1,39)	11,10 ($\pm$ 1,06)	13,75 ($\pm$ 1,17)	0,0829
Defeitos Totais (%)	24,12 ($\pm$ 5,41)	24,24 ($\pm$ 4,55)	26,67 ($\pm$ 4,37)	0,8502

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

Legenda: ¹Conc. Palheta: Número de espermatozoides por palheta (0,25mL), ²Conc. Mov. Pal: Número de espermatozoides móveis por palheta.

^{ab} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P<0,05$) no teste de Tukey.

Tabela 27 – Média ($\pm$ Erro padrão) das características espermáticas avaliadas pelo sistema computadorizado da motilidade espermática (CASA), nos grupos de fertilidade: Alta (A), Média (M) e Baixa (B)

Características espermáticas	Fertilidade do Sêmen			Valor de P
	A	M	B	
MT (%)	70,28($\pm$ 5,13)	63,32($\pm$ 4,14)	71,72($\pm$ 4,07)	0,2675
MP (%)	48,11($\pm$ 5,68)	48,08($\pm$ 4,67)	48,20($\pm$ 4,50)	0,9997
RAP (%)	58,48($\pm$ 4,50)	59,96($\pm$ 3,68)	63,22($\pm$ 3,57)	0,6205
VCL (μ m/s)	153,91($\pm$ 20,14)	153,93($\pm$ 18,50)	138,06($\pm$ 18,08)	0,3876
VSL (μ m/s)	73,90($\pm$ 5,93)	78,15($\pm$ 5,07)	71,41($\pm$ 4,86)	0,4121
VAP (μ m/s)	97,48($\pm$ 8,19)	98,79($\pm$ 7,41)	93,18($\pm$ 7,21)	0,5732
LIN (%)	53,19($\pm$ 5,46)	53,70($\pm$ 5,09)	56,13($\pm$ 5,0)	0,6428
STR (%)	78,05($\pm$ 3,4)	79,76($\pm$ 3,12)	77,30($\pm$ 3,05)	0,5052
ALH (μ m)	3,49($\pm$ 0,23)	3,30 ($\pm$ 0,20)	3,25 ($\pm$ 0,19)	0,6077
BCF (Hz)	14,55($\pm$ 2,99)	16,67 ($\pm$ 2,57)	14,45 ($\pm$ 2,47)	0,6319

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

Legenda: MT: Motilidade total, MP: Motilidade progressiva, RAP: Células rápidas, VCL: Velocidade curvilínea, VSL: Velocidade progressiva, VAP: Velocidade do trajeto, LIN: Linearidade, STR: Retilinearidade, ALH: Deslocamento lateral da cabeça, BCF: Frequência de batimentos da cauda

Tabela 28 – Média ($\pm$ Erro padrão) das características espermáticas avaliadas pelo uso de sondas fluorescentes, para leitura com microscopia de epifluorescência: nos grupos: Alta (A), Média (M) e Baixa fertilidade (B)

Características espermáticas	Fertilidade do Sêmen			Valor de P
	A	M	B	
PIAIA (%)	38,31 ($\pm$ 6,48)	37,35 ($\pm$ 5,43)	41,22 ($\pm$ 5,21)	0,7889
PLALS (%)	27,29 ($\pm$ 3,89)	24,23 ($\pm$ 3,35)	27,27 ($\pm$ 3,22)	0,5832
IMP (%)	46,95 ($\pm$ 4,88)	48,61 ($\pm$ 3,98)	52,56 ($\pm$ 3,86)	0,5598
IAM (%)	68,56 ($\pm$ 5,07)	68,54 ($\pm$ 4,46)	66,23 ($\pm$ 4,3)	0,8013
APM (%)	45,62 ($\pm$ 7,48)	44,63 ($\pm$ 6,44)	48,17 ($\pm$ 6,19)	0,8382

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

Legenda: PIAIA: Porcentagem de células com integridade de membrana plasmática e acrossomal com alto potencial de membrana mitocondrial, PLALS: porcentagem de células com lesão da membrana plasmática e acrossomal com baixo potencial de membrana mitocondrial e as características individuais: IMP: integridade de membrana plasmática, IMA: integridade de membrana acrossomal e APM: alto potencial de membrana mitocondrial.

Das análises realizadas pela citometria de fluxo também não foram detectadas diferenças entre os grupos de fertilidade ($P > 0,05$). Exceto para a produção de espécies reativas mitocondriais (MITOi) avaliados pela sonda MSR, que foi menor para o grupo B ($p \leq 0,05$) em comparação ao grupo M (Tabela 29).

Tabela 29 – Média ($\pm$ Erro padrão) das características espermáticas avaliadas por citometria de fluxo pelo uso de sondas fluorescentes, nos grupos de fertilidade: Alta (A), Média (M) e Baixa (B)

Características espermáticas	Fertilidade do Sêmen			Valor de P
	A	M	B	
MIAI (%)	50,42 ($\pm$ 6,55)	49,13 ($\pm$ 5,43)	53,21 ($\pm$ 5,52)	0,819
MAI (%)	80,06 ($\pm$ 4,68)	78,87 ($\pm$ 3,78)	74,72 ($\pm$ 3,95)	0,592
MI (%)	51,47 ($\pm$ 6,92)	49,85 ($\pm$ 5,71)	55,09 ($\pm$ 5,83)	0,752
MIHP (%)	37,6 ($\pm$ 10,7)	30,33 ($\pm$ 9,1)	36,48 ($\pm$ 9,66)	0,765
RELAÇÃO H:L (%)	4,92 ($\pm$ 1,95)	4,22 ($\pm$ 1,58)	3,46 ($\pm$ 1,73)	0,346
MITOi (ua)	358,0 ($\pm$ 80,2) ^{ab}	509,54 ($\pm$ 61,25) ^a	270,3 ($\pm$ 67,1) ^b	0,052*
MITO-MI (%)	4,94 ($\pm$ 1,4)	3,79 ($\pm$ 1,16)	3,53 ($\pm$ 1,11)	0,668
DHEi (ua)	362,42 ($\pm$ 58,64)	377,66 ($\pm$ 49,14)	275,48 ($\pm$ 47,14)	0,151
BODIPYi (ua)	1833,07 ($\pm$ 404,52)	1985,17 ($\pm$ 330,17)	1424,62 ($\pm$ 320,4)	0,368
DAF-MI (%)	39,04 ($\pm$ 5,34)	37,09 ($\pm$ 4,53)	40,14 ($\pm$ 4,82)	0,831
DAFi (ua)	4609,34 ($\pm$ 962,46)	3581,99 ($\pm$ 776,35)	3336,82 ($\pm$ 857,01)	0,537
DHRi (ua)	887,21 ($\pm$ 174,28)	996,04 ($\pm$ 133,11)	531,7 ($\pm$ 145,81)	0,084

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

Legenda: MIAI: porcentagem de células com integridade de membrana plasmática e acrossoma, MAI: integridade de membrana acrossomal, MI: integridade de membrana plasmática, MIHP: células com membrana íntegra e alto potencial mitocondrial, Relação H:L: relação entre alto e baixo potencial de membrana

mitocondrial, MITOi: intensidade de fluorescência da sonda Mitosox Red, MITO-MI: porcentagem de células com integridade de membrana e espécies reativas de oxigênio mitocondriais, DHEi: intensidade de fluorescência da sonda Dihidroetidium, BODIPYi: intensidade de fluorescência da sonda C11-BODIPY (581/591), DAFi: intensidade de fluorescência da sonda 4,5-diaminofluorescein-2/diacetate, DAF-MI: porcentagem de células com DAF positivo e membrana íntegra, DHRI: intensidade de fluorescência da sonda dihidrorodamina.

^{ab} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$) no teste de Tukey.

A variabilidade nas análises do sêmen foi determinada pelo cálculo do coeficiente de variação (CV). No presente estudo, o CV total encontrou-se entre 10,01 e 101,59%, a menor variação foi para a característica de retilinearidade (STR) avaliada pelo sistema computadorizado CASA e a maior foi para a relação de perda do potencial mitocondrial (Relação H:L). As características espermáticas mais variáveis foram os relacionados ao potencial de membrana mitocondrial (MIHP: 66,06%) e a produção de espécies reativas mitocondriais (MITO-MI: 79,04% e MITOi: 64,1%). A respeito dos grupos foi observado que o sêmen B tem variações mais elevadas das características espermáticas avaliadas por citometria de fluxo (DAFi, MITO-MI, MITOi, Relação H:L, MIHP) em comparação ao grupo de A e M (Tabela 30).

Na tabela 30 também são mostradas as correlações entre taxa de prenhez e as avaliações espermáticas *in vitro*. Não foram detectadas correlações entre TP e as análises convencionais. Pelo sistema CASA as únicas características que tiveram correlação com TP foram a motilidade total e progressiva, no entanto a correlação foram baixas e negativas ($r = -0,35$ e $-0,21$ respectivamente), VAP teve baixa correlação, mas foi positiva ($r = 0,21$). A TP não teve correlação com a avaliação das membranas e potencial mitocondrial pela microscopia de epifluorescência, mas, pela citometria de fluxo houveram várias correlações. A MIAI foi correlacionada negativamente ($r = -0,24$). As ROS mitocondriais e citoplasmáticas foram correlacionadas positivamente ($r = 0,33$ e $0,35$ respectivamente). Peroxidação lipídica correlacionou positivamente com TP ($r = 0,31$). Finalmente, a mais representativa correlação foi encontrada entre a produção de RNS e TP ($r = 0,41$).

Tabela 30 – Variabilidade total (CV total, %) e por grupo (CV fertilidade, %): Alta fertilidade (A), Média fertilidade (M) e Baixa fertilidade (B) e coeficientes de correlação de Spearman com taxa de prenhez (TP)

Características espermáticas	CV total (%)	Correlação com TP (r)	CV Fertilidade (%)		
			A	M	B
TP	17,03	1,00	6,52	3,29	18,48
Motilidade subjetiva	17,73	0,15	22,83	17,66	15,01
Vigor	21,42	0,08	22,29	15,83	16,67
Conc.Mov.pal. ¹	30,31	0,10	27,95	28,15	23,03
Defeitos totais	55,61	0,06	27,2	77,16	44,29
Sistema Computadorizado da Motilidade (CASA)					
MT (%)	17,18	-0,35†	18,52	19,99	15,77
MP (%)	23,41	-0,21	22,94	20,57	24,73
RAP (%)	15,58	-0,07	15,5	21,46	14,94
VCL (µm/s)	33,53	0,16	22,91	27,88	36,75
VSL (µm/s)	19,29	0,13	19,59	27,13	11,03
VAP (µm/s)	20,55	0,21	12,7	26,33	21,27
LIN (%)	25,22	0,03	33,92	12,06	26,52
STR (%)	10,01	-0,03	9,92	3,27	12,17
ALH (µm)	16,93	0,00	18,45	13,74	13,45
BCF (Hz)	43,49	-0,10	39,37	37,51	40,09
Análises por Microscopia de Epifluorescência					
PIAIA (%)	33,8	-0,13	41,94	32,9	29,01
PLALS (%)	34,84	0,13	33,86	27,32	34,86
IMP (%)	20,58	-0,27	25,83	22,92	16,44
IAM (%)	14,94	-0,03	20,27	16,33	10,87
APM (%)	34,05	-0,08	31,7	37,7	34,36
Análises por Citometria de fluxo					
MIAI (%)	30,07	-0,24	24,2	31,28	28,94
MAI (%)	13,44	-0,25	7,74	14,56	16,09
MI (%)	30,56	-0,36	24,43	33,86	28,99
MIHP (%)	66,06	-0,10	41,95	60,02	79,53
Relação H:L	101,59	0,08	51,93	34,91	134,03
MITOi (ua)	64,1	0,33†	60,88	57,24	70,77
MITO-MI (%)	79,04	0,33†	73,78	27,44	129,36
DHEi (ua)	37,49	0,35*	46,2	20,44	36,08
BODIPYi (ua)	57,09	0,31†	48,04	81,45	27,45
DAF-MI (%)	36,73	-0,32	27,24	39,77	32,2
DAFi (ua)	61,79	0,24	35,67	67,98	72,5
DHRi (ua)	59,96	0,41*	54,74	51,5	52,68

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

Legenda: Conc.Mov.Pal.¹: Número de espermatozoides móveis por palheta. MT: Motilidade total, MP: Motilidade progressiva, RAP: Células rápidas, VCL: Velocidade curvilínea, VSL: Velocidade progressiva, VAP: Velocidade do trajeto, LIN: Linearidade, STR: Retilinearidade, ALH: Deslocamento lateral da cabeça, BCF: Frequência de batimentos da cauda. MIAI: porcentagem de células com integridade de membrana plasmática e acrossoma, MAI: integridade de membrana acrossomal, MI: integridade de membrana plasmática, MIHP: células com membrana íntegra e alto potencial mitocondrial, Relação H:L: relação entre alto e baixo

potencial de membrana mitocondrial, MITOi: intensidade de fluorescência da sonda Mitosox Red, MITO-MI: porcentagem de células com integridade de membrana e espécies reativas de oxigênio mitocondriais, DHEi: intensidade de fluorescência da sonda Dihidroetidium, BODIPYi: intensidade de fluorescência da sonda C11-BODIPY (581/591), DAFi: intensidade de fluorescência da sonda 4,5-diaminofluoresceína-2/diacetate, DAF-MI: porcentagem de células com DAF positivo e membrana íntegra, DHRI: intensidade de fluorescência da sonda Dihidrorodamina.

†P<0,10 e *P<0,05. Indica diferença significativa pela correlação de Spearman.

6.5.2 Distribuição por quartis

Os resultados da análise convencional por quartis estão na Tabela 31. Mostrou que o grupo de menor Conc. Mov. Pal. ($3,7$ a $10,2 \times 10^6$ espermatozoides móveis) tinha maior TP ($60,02 \pm 0,013\%$), o quartil médio e superior não foram diferentes na TP. A TP foi maior no grupo que possui a maior proporção de DT ($P=0,0132$).

Tabela 31 – Média ($\pm$ Erro padrão) das características espermáticas avaliadas por técnicas convencionais e seu efeito na taxa de prenhez (%), nos grupos estabelecidos pela separação de quartis: Inferior, Médio e Superior

Características espermáticas	Quartis			Valor de P
	Inferior	Médio	Superior	
Motilidade subjetiva (%)	51,11 ($\pm 4,86$)	63,18 ($\pm 4,05$)	77,22 ($\pm 4,41$)	
Taxa de prenhez (%)	57,00 ($\pm 0,013$)	55,9 ($\pm 0,012$)	56,8 ($\pm 0,012$)	0,7729
Vigor (1-5)	2,38 ($\pm 0,22$)	3,0 ($\pm 0,0$)	3,81 ($\pm 0,26$)	
Taxa de prenhez (%)	55,84 ($\pm 0,010$)	57,05 ($\pm 0,013$)	57,36 ($\pm 0,013$)	0,6371
Conc. Mov. Pal. ¹ ($\times 10^6$)	8,32 ($\pm 2,0$)	12,83 ($\pm 1,35$)	17,34 ($\pm 2,24$)	
Taxa de prenhez (%)	60,02 ($\pm 0,013$) ^a	54,93 ($\pm 0,014$) ^b	55,39 ($\pm 0,012$) ^b	0,0132*
Defeitos Totais (%)	8,81 ($\pm 2,15$)	21,0 ($\pm 6,08$)	38,25 ($\pm 6,96$)	
Taxa de prenhez (%)	55,77 ($\pm 0,013$) ^b	54,83 ($\pm 0,010$) ^b	60,81 ($\pm 0,014$) ^a	0,0073*

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

Legenda: Conc. Mov. Pal.¹: Número de espermatozoides móveis por palheta

^{ab} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P<0,05$) no teste de Tukey.

O grupo com menor MT avaliado pelo CASA obteve maior TP ($P=0,027$) só quando comparado ao quartil com valores superiores. O VAP e o STR tiveram igual TP tanto para o quartil inferior e superior, diferindo só o quartil médio com menor TP. O quartil com valores superiores de BCF % obteve menor TP, do que o quartil inferior e médio (Tabela 32). Na avaliação por sondas fluorescentes por microscopia de epifluorescência não foi detectada a influência específica dos níveis das características avaliadas e a TP (Tabela 33).

Tabela 32 – Média ($\pm$ Erro padrão) das características da motilidade espermática avaliadas pelo sistema computadorizado da motilidade (CASA): e seu efeito na taxa de prenhez (%) nos grupos estabelecidos pela separação de quartis: Quartil Inferior, Médio e Superior

Características espermáticas	Quartis			Valor de P
	Inferior	Médio	Superior	
MT (%)	53,21 ($\pm$ 10,22)	71,58 ($\pm$ 1,85)	79,85 ($\pm$ 4,15)	
Taxa de prenhez (%)	58,81 ($\pm$ 0,01) ^a	56,28 ($\pm$ 0,010) ^{ab}	52,98 ($\pm$ 0,016) ^b	0,0277*
MP (%)	34,86 ($\pm$ 9,13)	52,88 ($\pm$ 4,29)	61,43 ($\pm$ 3,59)	
Taxa de prenhez (%)	57,55 ($\pm$ 0,011)	56,99 ($\pm$ 0,013)	54,98 ($\pm$ 0,012)	0,314
RAP (%)	49,33 ($\pm$ 6,15)	63,52 ($\pm$ 2,89)	72,16 ($\pm$ 3,91)	
Taxa de prenhez (%)	59,5 ($\pm$ 0,01) ^a	53,94 ($\pm$ 0,011) ^b	56,58 ($\pm$ 0,012) ^{ab}	0,0124*
VCL (μ m/s)	90,80 ($\pm$ 4,35)	133,15 ($\pm$ 26,79)	198,62 ($\pm$ 31,69)	
Taxa de prenhez (%)	55,57 ($\pm$ 0,013)	57,13 ($\pm$ 0,010)	56,59 ($\pm$ 0,014)	0,6709
VSL (μ m/s)	60,00 ($\pm$ 3,73)	72,88 ($\pm$ 5,08)	93,88 ($\pm$ 10,47)	
Taxa de prenhez (%)	57,62 ($\pm$ 0,011)	54,88 ($\pm$ 0,012)	57,12 ($\pm$ 0,012)	0,2715
VAP (μ m/s)	72,45 ($\pm$ 3,39)	92,17 ($\pm$ 10,74)	116,89 ($\pm$ 11,59)	
Taxa de prenhez (%)	57,74 ($\pm$ 0,02) ^a	52,78 ($\pm$ 0,0122) ^b	59,2 ($\pm$ 0,012) ^a	0,0035*
LIN (%)	39,83 ($\pm$ 6,54)	60,31 ($\pm$ 7,71)	74,84 ($\pm$ 4,63)	
Taxa de prenhez (%)	55,00 ($\pm$ 0,03)	56,78 ($\pm$ 0,011)	57,39 ($\pm$ 0,011)	0,4554
Taxa de prenhez (%)	57,87 ($\pm$ 0,012) ^a	54,31 ($\pm$ 0,011) ^b	58,36 ($\pm$ 0,013) ^a	0,0487*
ALH (μ m)	2,63 ($\pm$ 0,12)	3,06 ($\pm$ 0,24)	3,89 ($\pm$ 0,30)	
Taxa de prenhez (%)	56,60 ($\pm$ 0,012)	55,19 ($\pm$ 0,011)	58,34 ($\pm$ 0,013)	0,215
BCF (Hz)	8,40 ($\pm$ 0,53)	13,05 ($\pm$ 4,45)	22,52 ($\pm$ 1,17)	
Taxa de prenhez (%)	58,79 ($\pm$ 0,011) ^a	57,52 ($\pm$ 0,011) ^a	52,33 ($\pm$ 0,013) ^b	0,0042*

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

Legenda: Motilidade total (MT), Motilidade progressiva (MP), Células rápidas (RAP), Velocidade curvilínea (VCL), Velocidade progressiva (VSL), Velocidade do trajeto (VAP), Linearidade (LIN), Retilinearidade (STR), Deslocamento lateral da cabeça (ALH), Frequência de batimentos da cauda (BCF)

^{ab} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$) no teste de Tukey.

Tabela 33 – Média ($\pm$ Erro padrão) das características espermáticas avaliadas pelo uso de sondas fluorescentes sob microscopia de epifluorescência: e seu efeito na taxa de prenhez (%) nos grupos estabelecidos pela separação de quartis: Quartil Inferior, Médio e Superior

Características espermáticas	Quartis			Valor de P
	Inferior	Médio	Superior	
PIAIA (%)	24,83 ($\pm$ 9,81)	42,10 ($\pm$ 4,45)	54,98 ($\pm$ 4,25)	
Taxa de prenhez (%)	58,4 ($\pm$ 0,011)	54,67 ($\pm$ 0,012)	56,21 ($\pm$ 0,014)	0,093
PLALS (%)	15,94 ($\pm$ 2,99)	21,18 ($\pm$ 2,0)	32,56 ($\pm$ 7,32)	
Taxa de prenhez (%)	55,42 ($\pm$ 0,015)	55,73 ($\pm$ 0,011)	57,67 ($\pm$ 0,011)	0,3941
IMP (%)	37,50 ($\pm$ 5,54)	52,31 ($\pm$ 3,07)	63,28 ($\pm$ 3,85)	
Taxa de prenhez (%)	58,09 ($\pm$ 0,012)	56,81 ($\pm$ 0,010)	52,88 ($\pm$ 0,017)	0,0645
IMA (%)	57,94 ($\pm$ 8,00)	74,21 ($\pm$ 3,44)	82,75 ($\pm$ 3,62)	
Taxa de prenhez (%)	57,31 ($\pm$ 0,011)	56,53 ($\pm$ 0,012)	55,34 ($\pm$ 0,015)	0,5766
APM (%)	26,75 ($\pm$ 10,50)	49,81 ($\pm$ 7,10)	65,03 ($\pm$ 7,75)	
Taxa de prenhez (%)	58,42 ($\pm$ 0,03)	54,59 ($\pm$ 0,02)	57,20 ($\pm$ 0,03)	0,0676

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

Legenda: Porcentagem de células com integridade de membrana plasmática e acrossomal com alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA), porcentagem de células com lesão da membrana plasmática e acrossomal com baixo potencial de membrana mitocondrial (PLALS) e as características individuais: integridade de membrana plasmática (IMP) integridade de membrana acrossomal (IMA) e alto potencial de membrana mitocondrial (APM)

^{ab} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$) no teste de Tukey.

Nas avaliações por citometria de fluxo, os quartis inferior e médio para a população MIAI MAI e MI apresentou maior TP ($P = < 0,05$). Quando a relação de H:L do potencial de membrana mitocondrial era menor, houve maior TP ($P = 0,04$). Os valores de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (MITOi, DHEi, DHRi) mostraram o mesmo padrão, quanto maior o valor do quartil maior a TP (Tabela 34).

Tabela 34 – Média ($\pm$ Erro padrão) das características espermáticas avaliadas por citometria de fluxo pelo uso de sondas fluorescentes e seu efeito na taxa de prenhez (%) nos grupos estabelecidos pela separação de quartis: Inferior, Médio e Superior

Características espermáticas	Quartis			Valor de P
	Inferior	Médio	Superior	
MIAI (%)	35,68 ($\pm$ 6,13)	51,59 ($\pm$ 7,41)	69,15 ($\pm$ 5,38)	
Taxa de prenhez (%)	57,15 ($\pm$ 0,011) ^a	58,56 ($\pm$ 0,010) ^a	48,75 ($\pm$ 0,021) ^b	0,001*
MAI (%)	64,68 ($\pm$ 10,31)	80,64 ($\pm$ 2,44)	87,40 ($\pm$ 4,88)	
Taxa de prenhez (%)	54,35 ($\pm$ 0,014) ^a	58,62 ($\pm$ 0,009) ^a	53,51 ($\pm$ 0,03) ^b	0,02*
MI (%)	35,05 ($\pm$ 6,08)	51,89 ($\pm$ 7,57)	71,88 ($\pm$ 5,14)	
Taxa de prenhez (%)	57,18 ($\pm$ 0,011) ^a	58,51 ($\pm$ 0,010) ^a	48,75 ($\pm$ 0,021) ^b	0,001*
MIHP (%)	9,72 ($\pm$ 5,46)	30,70 ($\pm$ 8,9)	62,10 ($\pm$ 10,26)	
Taxa de prenhez (%)	57,67 ($\pm$ 0,012)	57,16 ($\pm$ 0,011)	54,61 ($\pm$ 0,01)	0,32
Relação H:L	0,23 ($\pm$ 0,14)	1,78 ($\pm$ 0,84)	4,86 ($\pm$ 1,45)	
Taxa de prenhez (%)	58,09 ($\pm$ 0,014) ^a	58,86 ($\pm$ 0,012) ^a	54,06 ($\pm$ 0,01) ^b	0,04*
MITO-MI (%)	0,65 ($\pm$ 0,26)	3,22 ($\pm$ 1,32)	7,76 ($\pm$ 1,55)	
Taxa de prenhez (%)	56,65 ($\pm$ 0,023)	56,92 ($\pm$ 0,009)	55,85 ($\pm$ 0,013)	0,80
MITOi (ua)	209,56 ($\pm$ 24,09)	320,12 ($\pm$ 63,57)	685,69 ($\pm$ 243,94)	
Taxa de prenhez (%)	52,07 ($\pm$ 0,017) ^b	57,41 ($\pm$ 0,009) ^a	57,52 ($\pm$ 0,012) ^a	0,04*
DHEi (ua)	217,25 ($\pm$ 33,93)	282,62 ($\pm$ 29,70)	459,63 ($\pm$ 143,08)	
Taxa de prenhez (%)	51,42 ($\pm$ 0,016) ^b	57,02 ($\pm$ 0,010) ^a	59,15 ($\pm$ 0,012) ^a	0,0029*
BODIPYi (ua)	702,88 ($\pm$ 68,75)	1617,54 ($\pm$ 594,68)	3053,94 ($\pm$ 600,98)	
Taxa de prenhez (%)	49,02 ($\pm$ 0,03) ^b	58,95 ($\pm$ 0,02) ^a	56,15 ($\pm$ 0,02) ^{ab}	0,0003*
DAFi (ua)	2212,50 ($\pm$ 624,64)	3512,17 ($\pm$ 546,49)	6632,00 ($\pm$ 2317,31)	
Taxa de prenhez (%)	56,6 ($\pm$ 0,012) ^{ab}	54,96 ($\pm$ 0,011) ^b	60,41 ($\pm$ 0,015) ^a	0,03*
DHRi (ua)	383,13 ($\pm$ 46,49)	655,38 ($\pm$ 189,66)	1486,88 ($\pm$ 354,31)	
Taxa de prenhez (%)	50,65 ($\pm$ 0,012) ^b	59,94 ($\pm$ 0,012) ^a	58,62 ($\pm$ 0,012) ^a	<,0001*
DAF-MI (%)	26,13 ($\pm$ 5,81)	38,98 ($\pm$ 3,32)	54,44 ($\pm$ 7,69)	
Taxa de prenhez (%)	60,21 ($\pm$ 0,011) ^a	56,54 ($\pm$ 0,012) ^b	51,49 ($\pm$ 0,015) ^c	0,0008*

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

Legenda: Porcentagem de células com integridade de membrana plasmática e acrossoma (MIAI), Integridade de membrana acrossomal (MAI), Integridade de membrana plasmática (MI), células com membrana íntegra e alto potencial mitocondrial (MIHP), Baixo potencial de membrana mitocondrial (LPM) e Alto potencial de membrana mitocondrial (HPM), Relação entre alto e baixo potencial de membrana mitocondrial (Ratio H:L), Intensidade de fluorescência da sonda Mitosox Red (MITOi), porcentagem de células com integridade de membrana e espécies reativas de oxigênio mitocondriais (MITO_MI), Intensidade de fluorescência da sonda Dihidroetidium (DHEi), Intensidade de fluorescência da sonda C11-BODIPY (581/591), (BODIPYi), Intensidade de fluorescência da sonda 4,5-diaminofluorescein-2/diacetate (DAFi), porcentagem de células com DAF positivo e membrana íntegra (DAF_MI), Intensidade de fluorescência da sonda Dihidrorodamina (DHRi),

^{ab} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$) no teste de Tukey.

6.5.3 Correlações estatísticas

A integridade de membrana plasmática e acrossoma íntegro (MIAI) avaliados pela citometria mostrou correlação positiva com a avaliação por sondas pela microscopia de epifluorescência para porcentagem de células PIAIA, IMP e AMP, exceto para a porcentagem de acrossoma íntegro (IMA). Pelo contrário, houve correlação negativa com a produção de espécies oxidativas mitocondriais (MITO-MI) e citoplasmáticas (DHEi) (Tabela 35).

Tabela 35 – Coeficientes de correlação de Spearman entre a porcentagem de células com integridade de membrana plasmática e acrossoma íntegro (MIAI) avaliada pela citometria de fluxo e as demais características espermáticas avaliadas tanto pelo convencional, sondas fluorescentes e citometria de fluxo, sendo colocados unicamente as características que tiveram significância estatística

	Coeficiente r	Valor de p
PIAIA (%)	0,39	0,04*
IMP (%)	0,49	0,008*
APM (%)	0,35	0,06†
MIHP (%)	0,51	0,009*
MITO-MI (%)	-0,54	0,003*
DHEi (ua)	-0,35	0,06†
DAF_MI (%)	0,39	0,05*

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

Legenda: Porcentagem de células com integridade de membrana plasmática e acrossomal com alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA), integridade de membrana plasmática (IMP), alto potencial de membrana mitocondrial (APM), células com membrana íntegra e alto potencial mitocondrial (MIHP), porcentagem de células com integridade de membrana e espécies reativas de oxigênio mitocondriais (MITO_MI), Intensidade de fluorescência da sonda Dihidroetidium (DHEi) e porcentagem de células com DAF positivo e membrana íntegra (DAF_MI).

† $p \leq 0,09$ † $P < 0,10$ e * $P < 0,05$. Indica significância pela correlação de Spearman

Por outro lado, a presença de espécies reativas mitocondriais em espermatozoides com membrana íntegra (MITO-MI) correlacionou negativamente com defeitos totais (DT), Motilidade total (MT), células rápidas (RAP) e DAF-MI. A peroxidação lipídica pelo BODIPYi foi positivamente correlacionada, semelhantes aos DHEi e DHRi (Tabela 36). Observou-se várias correlações negativas para produção de espécies reativas citoplasmáticas (DHEi) com PIAIA, CON. PAL, MIAI, MI, MIHP e DAF-MI (Tabela 37).

Tabela 36 – Coeficientes de correlação de Spearman entre a porcentagem de células com integridade de membrana e espécies reativas de oxigênio mitocondriais (MITO-MI) avaliadas pela citometria de fluxo e as demais características espermáticas avaliadas tanto pelo convencional, sondas fluorescentes, CASA e citometria de fluxo, sendo colocados unicamente as características que tiveram significância estatística

	Coeficiente r	Valor de p
DT (%)	-0,33	0,07†
MT (%)	-0,38	0,04
RAP (%)	-0,42	0,02*
DHEi (ua)	0,43	0,01
BODIPYi (ua)	0,48	0,008*
DAF-MI (%)	-0,44	0,02*
DHRi (ua)	0,37	0,04*

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

Legenda: Defeitos totais (DT), Motilidade total (MT), Células rápidas (RAP), Intensidade de fluorescência da sonda Dihidroetidium (DHEi), Intensidade de fluorescência da sonda C11-BODIPY (581/591), (BODIPYi), porcentagem de células com DAF positivo e membrana íntegra (DAF_MI).

† $p \leq 0,09$ † $P < 0,10$ e * $P < 0,05$. Indica significância pela correlação de Spearman

Tabela 37 – Coeficientes de correlação de Spearman entre a intensidade de fluorescência da sonda Dihidroetidium (DHEi) avaliada pela citometria de fluxo e as demais características espermáticas avaliadas tanto pelo convencional, sondas fluorescentes, CASA e citometria de fluxo, sendo colocados unicamente as características que tiveram significância estatística

	Coeficiente r	Valor de p
PIAIA (%)	-0,42	0,02*
CONC. PAL ($\times 10^6$).	-0,32	0,09†
MI (%)	-0,34	0,07†
MIHP (%)	-0,30	0,03*
MITOi (ua)	0,65	0,0001*
BODIPYi (ua)	0,50	0,005*
DHRi (ua)	0,56	0,001*

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

Legenda: Número de espermatozoides por palheta (Conc Pal), Porcentagem de células com integridade de membrana plasmática e acrossomal com alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA), integridade de membrana plasmática (MI), células com membrana íntegra e alto potencial mitocondrial (MIHP), Intensidade de fluorescência da sonda Mitosox Red (MITOi), Intensidade de fluorescência da sonda Dihidrorodamina (DHRi).

† $p \leq 0,09$ † $P < 0,10$ e * $P < 0,05$. Indica significância pela correlação de Spearman

A presença de DAF-MI mostrou correlação com características da motilidade avaliadas pelo CASA e com a análise de sondas fluorescentes por microscopia e citometria de fluxo (Tabela 38). Foi encontrado que a maior presença de NO em espermatozoides com membrana íntegra, tinham menor produção de ROS e RNS. Na tabela 39 a detecção de RNS pelo DHRi correlacionou negativamente com MT, RAP, BCF, PIAIA e DAF-MI. As correlações positivas foram com BODIPY ($r=0,68$, $P=0,00003$), MITOi e DHEi.

Tabela 38 – Coeficientes de correlação de Spearman entre porcentagem de células com DAF positivo e membrana íntegra (DAF-MI) avaliada pela citometria de fluxo e as demais características espermáticas avaliadas tanto pelo convencional, sondas fluorescentes, CASA e citometria de fluxo

	Coeficiente r	Valor de p
Conc. Pal. ($\times 10^6$) [†]	0,42	0,03*
MT(%)	0,39	0,04
VCL ($\mu\text{m/s}$)	0,40	0,04*
LIN (%)	-0,54	0,004*
STR (%)	-0,40	0,04
BCF (Hz)	0,64	0,0004*
PIAIA (%)	0,52	0,006*
IMP (%)	0,47	0,01*
MIAI (%)	0,39	0,05*
MIHP (%)	0,39	0,06
MITO-MI (%)	-0,44	0,05*
MITOi (ua)	-0,68	0,0001*
DHEi (ua)	-0,56	0,002*
BODIPYi (ua)	-0,65	0,002*
DHRi (ua)	-0,57	0,002*

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

Legenda: Número de espermatozoides por palheta $\times 10^6$ (Conc. Pal), Motilidade total (MT), Velocidade curvilínea (VCL), Linearidade (LIN), retilinearidade (STR), Frequência de batimento da cauda (BCF), Porcentagem de células com integridade de membrana plasmática e acrossomal com alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA), integridade de membrana plasmática (IMP), Porcentagem de células com integridade de membrana plasmática e acrossoma (MIAI), células com membrana íntegra e alto potencial mitocondrial (MIHP), Intensidade de fluorescência da sonda Mitosox Red (MITOi), porcentagem de células com integridade de membrana e espécies reativas de oxigênio mitocondriais (MITO-MI), Intensidade de fluorescência da sonda Dihidroetidium (DHEi), Intensidade de fluorescência da sonda C11-BODIPY (581/591), (BODIPYi), Intensidade de fluorescência da sonda Dihidrorodamina (DHRi).

† $p \leq 0,09$ † $p < 0,10$ e * $p < 0,05$. Indica significância pela correlação de Spearman

Tabela 39 – Coeficientes de correlação de Spearman entre a intensidade de fluorescência da sonda Dihidrorodamina (DHRi) avaliada pela citometria de fluxo e as demais características espermáticas avaliadas tanto pelo convencional, sondas fluorescentes, CASA e citometria de fluxo

	Coeficiente r	Valor de p
Conc. Mov. Pal. ($\times 10^6$) [†]	-0,38	0,09*
MT (%)	-0,36	0,05
RAP (%)	-0,45	0,03*
BCF (%)	-0,33	0,05
PIAIA (%)	-0,44	0,05*
MIAI (%)	-0,40	0,05*
MITOi (ua)	0,47	0,0001*
DHEi (ua)	0,56	0,001*
BODIPYi (ua)	0,68	0,00003*

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

Legenda: Número de espermatozoides por palheta $\times 10^6$ (Conc. Mov. Pal), Células rápidas (RAP), Frequência de batimento da cauda (BCF), Porcentagem de células com integridade de membrana plasmática e acrossomal com alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIA), alto potencial de membrana mitocondrial (APM), Intensidade de fluorescência da sonda Mitosox Red (MITOi), Intensidade de fluorescência da sonda

Dihidroetidium (DHEi), Intensidade de fluorescência da sonda C11-BODIPY (581/591), (BODIPYi), porcentagem de células com DAF positivo e membrana íntegra (DAF_MI).

† $p \leq 0,09$ e * $p \leq 0,05$ Indica significância pela correlação de Spearman

6.6 DISCUSSÃO

Neste estudo foram realizadas análises multiparamétricas através de sondas fluorescentes para monitorar a integridade das membranas plasmática e acrossomal, e a integridade da membrana em células com alto potencial de membrana mitocondrial, além de outros marcadores de função mitocondrial: capacidade oxidativa mitocondrial e citoplasmática, produção de óxido nítrico, presença de peróxidos, além da avaliação da peroxidação lipídica de amostras de sêmen bovino utilizadas para IATF, no desafio de conhecer como a qualidade seminal reflete nos níveis de fertilidade a campo. As análises foram semelhantes no tempo, mas não foram feitas as mensurações nos mesmos espermatozoides, devido a que ainda não é possível aferir todas estas características em uma única célula ao mesmo tempo. Estas análises permitiram constatar que a qualidade seminal influencia nos resultados da fertilidade *in vivo*.

Apesar das análises convencionais do sêmen, indicarem que a seleção prévia de partidas seguindo as sugestões do CBRA (2013) para uso na IA melhora os resultados na taxa de prenhez a campo, as diferenças de qualidade entre ejaculados e touros e a própria heterogeneidade do ejaculado traz a necessidade da aplicação de técnicas mais sensíveis para detectar os problemas no sêmen que levam a diminuição da prenhez. A fertilidade do touro contribui significativamente nas falhas reprodutivas, entre 20 e 40% dos touros podem ser sub-férteis; estes touros retardam a concepção, prolongam a época de parição, reduzem os pesos de desmame e incrementam o número de fêmeas abatidas, resultando em perdas econômicas e ameaças da sustentabilidade de uma exploração pecuária (KASTELIC, 2013). No entanto, devido à complexidade dos processos reprodutivos já relatados (AMANN e HAMMERSTEDT, 2002), diversos fatores podem limitar o sucesso dos programas de IATF, tanto ambientais, próprios da fêmea, como do sêmen e suas características (OLIVEIRA et al., 2012), assim como de fatores desconhecidos.

No experimento I a média da taxa de prenhez (TP) foi de 55,20%, muito próximo do relatado na literatura, sendo o valor esperado de 50% de TP em bovinos *Bos indicus* submetidos a IATF (OLIVEIRA et al., 2013; SÁ FILHO et al., 2009). Coincidindo com um

trabalho recente que mostrou a taxa de prenhez em vacas pluríparas: 56% (680/1223), primíparas: 51% (173/338) e novilhas: 57% (514/903), sendo na média do 50% para IATF (MARQUES et al., 2015). No entanto, houve TP com valores acima e abaixo da média (27,78% e 71%). Baseados nestes resultados se evidencia que a qualidade do sêmen contribuiu para o sucesso da fertilidade. Dessa maneira, as partidas que não cumpriram com os padrões mínimos foram descartadas resultando em boas taxas de prenhez.

Os grupos propostos para o nível de fertilidade de acordo com a taxa de prenhez por partida foram: o grupo de baixa TP ($45,6 \pm 8,47\%$), com mínima: 27,78% e máxima: 52%, o grupo de média TP ($56,25 \pm 1,91\%$), mínima: 54% e máxima: 59%, finalmente o grupo de alta TP ($65,6 \pm 3,82\%$), mínima: 61% e máxima: 71%. Sutis diferenças nos níveis de fertilidade entre grupos, com uma diferença de 2% entre a máxima de um grupo e a mínima do outro grupo, reduzem as chances de detectar influência das características espermáticas com os resultados de fertilidade.

As análises convencionais não explicaram as diferenças da taxa de prenhez (TP), considerando que as partidas para IA foram previamente selecionadas de acordo com o Manual do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013), dessa forma, diferenciar a fertilidade a campo de uma amostra de sêmen requiere de análises que complementem a análise convencional. Coincidindo com a afirmação de outros autores (CORREA; PACE; ZAVOS, 1997; GILLAN; EVANS; MAXWELL, 2005; OLIVEIRA et al., 2013; NAGY et al., 2015; SELLEM et al., 2015; SANTOS, 2016a).

Importante salientar que as estimativas de fertilidade com base na média não corrigida para o rebanho, época, idade da vaca, mês de inseminação e técnico ao avaliar touros em termos de fertilidade podem conduzir a erros, tornando-se imprescindível corrigir os dados (ZANG et al., 1999). Assim, este trabalho possui informação relevante da fertilidade de touros usados na IATF a campo no experimento I e análises não só da qualidade do sêmen e a taxa de prenhez, senão do cálculo do escore de fertilidade incluindo fatores ambientais, efeitos do ano, da estação reprodutiva, e fatores da fêmea no experimento II.

O sêmen de alta TP e baixa TP tiveram a mesma concentração de espermatozoides móveis por palheta. Porém, as chances de sucesso na fecundação que uma amostra de sêmen tem, podem não ser incrementadas simplesmente pelo fato de aumentar o número de espermatozoides na dose inseminante (CHENOWETH, 2005). A explicação é bem relatada na literatura (KASTELIC, 2013), referente às anormalidades compensáveis, que podem ser superadas aumentando a dose usada para IA. Portanto, acredita-se que as anormalidades no

sêmen de baixa fertilidade estejam associadas a alterações não compensáveis, que levou a falha no processo de fecundação ou durante a embriogenese.

No experimento I, a concentração mínima foi de $3,7 \times 10^6$ e a máxima foi de $20,6 \times 10^6$ espermatozoides móveis na palheta. A diferença na concentração entre partidas reduz as chances de detectar a influência nos resultados de fertilidade da população espermática com a alteração. Segundo Den Dass (1992), a relação entre algumas características seminais (avaliadas em laboratório) e a fertilidade tem sido inconsistente em decorrência do número definido de espermatozoides por inseminação, que às vezes é elevado.

Sobre a influência da qualidade do sêmen em relação à avaliação das características da motilidade pelo CASA. Foi determinado que as características de movimento de um espermatozoide não afetam o resultado da fertilidade *in vivo* após IATF. Apesar que numericamente foi visualizado que as partidas de baixa fertilidade apresentaram porcentagens inferiores de VCL, VSL, e VAP em comparação as partidas de média e alta fertilidade. Por outro lado, quando foi feita a análise dos valores baixos, médios e altos para cada características da motilidade espermática com relação a TP%, foram encontrados dados controversos para a MT e espermatozoides RAP. De acordo com os resultados, valores inferiores de MT e RAP resultam em maior TP%, que os valores superiores, sem diferir dos valores médios. Também foi encontrado que valores inferiores de BCF% ($8,40 \pm 0,53$) tem maior a fertilidade (TP= $58,79 \pm 0,011$) do que valores médios e superiores de BCF ($13,05 \pm 4,45$ e $22,52 \pm 1,17$) com TP ($57,52 \pm 0,011$ e $52,33 \pm 0,013$) respectivamente.

As características da motilidade avaliadas pelo sistema CASA não correlacionaram com a TP após a IATF. Unicamente para MT. No entanto, a correlação mostrou valores negativos para MT em relação à TP ($-0,35$; $P=0,06$). Similares resultados publicados por GILLAN et al. (2008), onde a motilidade total e progressiva e outras características da motilidade não correlacionam com fertilidade, exceto pelo VSL ($r=0,636$ $P=0,048$). Em outros estudos as correlações entre a MT e MP não foram consistentes em relação a taxa de não retorno (NRR) (GRAHAM et al., 1980). No entanto, a taxa de não retorno não é um valor preciso em comparação a taxa de prenhez.

Diferindo dos presentes resultados, altas e positivas correlações entre os características do CASA e fertilidade de touros foram relatados (OLIVEIRA et al., 2013, NAGY et al., 2015, FARELL et al., 1998, VERSTEGEN et al., 2002). É importante relatar que as características mencionadas como importantes preditores de fertilidade no estudo de Oliveira et al. (2013), foram a MT e MP. Neste caso, a avaliação foi feita pelo sistema IDENT do CASA, utilizando a sonda Hoechst 33342 para marcar o DNA de todas os

espermatozoides e reduzir os erros por marcação de partículas próprias do diluidor. Estes autores encontraram também que a determinação dos características do CASA após 2 horas do teste de termoresistência (TTR) permitiu identificar mais variáveis que foram bons preditores de fertilidade *in vivo*.

Outro estudo observou que o VAP tem melhor correlação ($r=0,66$ e $P=0,036$) com NRR30d e taxa de prenhez aos 75 dias e pode ser útil na predição do potencial de fertilidade de uma partida de sêmen (NAGY et al., 2015). Quando combinadas as variáveis do CASA (BCF, LIN, VAP, VSL, STR) a chance de encontrar relação com fertilidade contribui para altos coeficientes de determinação ($R^2=0,97$) (FARREL et al., 1998).

A falta de correlação entre as características do CASA e a fertilidade pode ser devido às diferenças entre touros. Fatores próprios da genética do touro ou do ejaculado poderiam fazer que os espermatozoides respondam de formas diferentes, tais como diminuir ou ativar seu metabolismo quando submetidos a estresse e a outras condições como diluição no TALP. Outros autores também atribuíram a falta de correlação à variação individual entre touros e ao número de espermatozoides na dose inseminante (NAGY et al., 2015).

Com respeito à avaliação com sondas fluorescentes, não foi encontrada correlação entre TP e as populações detectadas pelas sondas fluorescentes por microscopia de epifluorescência. Também, considerando apenas o número de espermatozoides PIAIA, só três partidas tiveram menos que 20% de espermatozoides PIAIA, o que justifica não haver encontrado diferenças nos grupo de fertilidade para estas características. Quando o sêmen contem 8,5% de PIAIA avaliado por sondas fluorescentes, reduz a fertilidade em relação a partidas contendo 44,5% de células PIAIA, com uma diferença de 28,5% na TP entre elas (OLIVEIRA et al., 2014).

Quando utilizado o FITC-PSA na microscopia a porcentagem de espermatozoides com acrossoma íntegro (IAM) foi igual para os grupos de fertilidade alta: $68,56 \pm 5,07\%$, média: $68,54 \pm 4,46\%$ e baixa $66,23 \pm 4,3\%$. A técnica utilizada foi descrita por Celeghini et al. (2008). Estes autores quando utilizaram a mesma técnica encontraram para sêmen bovino criopreservado um $68,8 \pm 0,9\%$ de integridade de acrossoma.

O PSA foi proposto por Cross et al. (1986), pela afinidade deste componente aos resíduos de glicoproteínas com α -D-glicosil e α -D-manosil que são abundantes no acrossoma do espermatozoide, mas não necessariamente estão confinados no acrossoma (MENDOZA et al., 1992). Surge o FITC-PNA que se liga na membrana acrossomal externa, com menos ligações inespecíficas a outros compartimentos do espermatozoide e sem ligação a

glicoproteínas da gema de ovo (HOSSAIN et al., 2011). Tal fato, conduziu ao uso do FITC-PNA para monitorar mais acuradamente a integridade do acrossoma.

No estudo não foram encontradas diferenças significativas entre grupos de alta, média e baixa taxa de prenhez na porcentagem da população de espermatozoides com acrossoma íntegro na dose de IA, nem pela microscopia (FITC-PSA), nem pela citometria de fluxo (FITC-PNA). Entretanto, a correlação com a TP e a porcentagem de células com integridade de membrana plasmática e acrossoma (MAI) foi negativa. No entanto, OLIVEIRA et al. (2013), utilizaram o FITC-PSA na avaliação por citometria de fluxo e encontraram que a integridade da membrana acrossomal é um bom preditor da taxa de concepção. Os valores mínimos e máximos que eles encontraram nas partidas de sêmen de touros foram de 31,1 até 60,3%. Estes valores são similares aos encontrados no presente estudo para MAI (25,41% a mínima e 77,16% a máxima). Isto pode ser devido a o acrossoma ter sido avaliado usando a sonda FITC-PNA pela citometria. Embora o PNA marque danos iniciais das membranas externas do acrossoma, esta sonda precisa de permeabilização com metanol por 30 segundos (COOPER; YEUNG, 1998). Isto pode explicar que o FITC-PNA para a população de espermatozoides com membrana íntegra e acrossoma reagido (ARMI) fosse tão baixo (0,01% até 0,4%). Outra possível explicação seria a dose utilizada, que foi baixa em comparação ao uso de 1 μ L de FITC-PNA (1mg/mL), utilizada por Anzar et al. (2011). Outro estudo também utilizou 2,3 μ L FITC-PNA (1 mg/mL), sem permeabilização, para sêmen bovino criopreservado encontraram na média 84,1% dos espermatozoides tinham o acrossoma íntegro (GARNER; THOMAS; GRAVANCE, 1999). Ao comparar esses dados com os resultados deste estudo nota-se que a média para os grupos alta, média e baixa fertilidade a porcentagem de espermatozoides com membrana acrossomal íntegra (MAI%) foi similar ($80,06 \pm 4,68$, $78,87 \pm 3,78$ e $74,72 \pm 3,95\%$, respectivamente).

Quando realizada a ANOVA para os grupos de fertilidade a campo, a alta fertilidade foi similar que as partidas de média e baixa fertilidade em relação ao potencial de membrana mitocondrial quando utilizado o JC-1 na microscopia e na citometria de fluxo. Não se detectou diferença significativa, isto pode ser devido ao alto coeficiente de variação encontrado. Apesar de numericamente ser observado que o grupo com baixa fertilidade teve maior porcentagem de espermatozoides com alto potencial mitocondrial (APM) pela microscopia de epifluorescência. Em condições de estresse pode ser mais favorável um baixo potencial mitocondrial, pois nessas condições os espermatozoides apresentariam menor potencial de liberação de fatores pró-oxidativos intra-mitocondriais (CASTRO et al., 2016).

Como observado na avaliação por citometria de fluxo, a proporção de fluorescência do JC-1 de vermelho para verde é menor no grupo de baixa fertilidade ($3,46 \pm 1,73$) em comparação ao de alta fertilidade ($4,92 \pm 1,95$). Quando há perda do potencial mitocondrial, a proporção diminui e é possível monitorar as mudanças da função mitocondrial.

Os biomarcadores da função mitocondrial avaliados neste experimento são ferramentas chave para determinar a qualidade espermática, mas seu impacto na fertilidade ainda precisa de mais estudos. O principal biomarcador é o potencial de membrana mitocondrial, que pode ser avaliado usando JC-1, uma sonda catiônica com afinidade pela mitocôndria que se acumula na matriz mitocondrial (GARNER et al., 1999). Esta sonda foi relacionada com altas taxas de fertilização *in vitro* e alto potencial mitocondrial, quando as amostras eram divididas em baixo, médio e alto potencial mitocondrial (KASAI et al., 2002). Entretanto, neste experimento, a classificação de partidas como alta, média e baixa porcentagem de espermatozoides com MIHP por citometria ou com APM pela microscopia, em nenhum dos casos mostrou diferença na fertilidade para estes grupos. Pelo contrário, observou-se uma tendência de maior taxa de prenhez no grupo com menor porcentagem de espermatozoides com APM ($P=0,06$) em comparação ao grupo com média e alta porcentagem de APM. Petrunkina et al. (2007) determinam que as taxas nas quais certas funções espermáticas são expressas variam grandemente. É suposto que o tempo de resposta ao aumento do potencial mitocondrial não foi alcançado aos 10 minutos da incubação, precisando ter feito avaliações aos 30 minutos de incubação junto com as outras avaliações dos marcadores mitocondriais. Por outro lado, podemos especular que o potencial mitocondrial não é essencial para a produção de espécies reativas, devido a que encontramos maior produção de ROS e RNS no grupo com maiores taxas de prenhez, mas apresentando baixo potencial mitocondrial, como acontece com o espermatozoide de humano (KOPPERS et al., 2008).

Neste estudo foram encontradas correlações positivas entre a função mitocondrial avaliada pela sonda MSR com taxa de prenhez e outras características espermáticas. Correlações entre função mitocondrial e fertilidade são variáveis principalmente da função mitocondrial sobre o tempo (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ., 2013), pela manipulação da amostra (GARCÍA et al., 2012) e dos níveis e capacidade antioxidante, que vão controlar o balanço da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (AM-IN et al., 2011).

A mitocôndria produz substâncias do metabolismo do oxigênio procedente do processo de respiração celular durante a produção de ATP, é conhecido que certo nível de ROS é fisiologicamente necessário para a função espermática e para o próprio processo de

fecundação (GUTHRIE; WELCH, 2006). Assim a presença de ROS é vital para o espermatozoide, mas, altos níveis de ROS e perda do balanço entre produção e remoção levam ao estresse oxidativo (GUTHRIE et al., 2008). Os níveis de ROS são muito variáveis, o que torna sua determinação difícil, as ROS podem ser monitoradas pelas sondas como DHE, MITOSOX Red e BODIPY (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2013).

De maneira semelhante ao MITOi, MITO-MI, outras correlações positivas foram encontradas entre taxa de prenhez e DHEi, DHRI e Bodipy. A correlação entre o MITOi e o DHEi também foi relatada por Koppers et al. (2008). Devido ao MSR ser derivado do DHE, mas é um composto catiônico que tem afinidade pela matriz mitocondrial e o DHE é citoplasmático. As correlações que apresentaram relação negativa com a taxa de prenhez foram: a motilidade total (MT, $r=-0,35$, $P=0,06$), porcentagem de células com integridade de membrana plasmática e acrossoma (MAI, $r=-0,24$, $P>0,05$) e porcentagem de células com DAF e membrana íntegra (DAF-MI%, $r=-0,32$, $P>0,05$).

Correlação negativa e de média intensidade ($r=-0,38$, $P=0,04$) entre MT e MITO-MI, pode ocorrer por alterações mitocondriais, presença de gota protoplasmática proximal e incremento da produção de espécies reativas mitocondriais leva a uma deterioração da motilidade (GUTHRIE; WELCH; LONG, 2008). No entanto, destacando que no este estudo, não levou a queda da fertilidade *in vivo*, pelo contrário, um nível de espécies reativas de oxigênio mitocondriais foi positivamente correlacionado com fertilidade.

Para determinar a peroxidação lipídica das membranas plasmática e na mitocôndria. Neste estudo foi determinada a mediana da intensidade da sonda BODIPY, nos espermatozoides com membrana plasmática íntegra. Oliveira et al. (2012) relataram relativamente pouca peroxidação lipídica em espermatozoides com membrana íntegra e membrana lesada, porém, encontraram maior susceptibilidade ao estresse oxidativo no sêmen com maior peroxidação.

Foi relatado que a peroxidação lipídica é uma característica espermática relacionada negativamente com fertilidade a campo (OLIVEIRA et al., 2013, KASIMANICKAM et al., 2007). Os resultados deste estudo discordam desses achados, devido a que a peroxidação oxidativa teve correlação positiva com taxa de prenhez. Os dados sugerem que o dano peroxidativo marcado pelo BODIPY só é prejudicial para a fertilidade quando a produção de ROS na matriz mitocondrial supera as enzimas de defesa antioxidante intramitocondrial (SOD, GPx, Catalase) (KOPPERS et al., 2008). Por sua vez, o dano peroxidativo encontrado nas partidas do experimento I levou a perda da motilidade total ($r= 0,27$, $P=0,10$). Outras correlações foram encontradas por Gurler et al. (2015), neste estudo houve correlação

positiva entre peroxidação lipídica e presença de SOD e correlação negativa com capacidade antioxidante total (TAC). Os mecanismos antioxidantes não foram avaliados neste experimento, mas a presença deles pode levar a alterações na detecção da produção de ROS, RNS pelas sondas fluorescentes. A produção de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) que é detectado pelo MSR, pode ser revertida pela presença concomitante da Superóxido dismutase (SOD), que transforma o $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 , um radical livre que escapa da mitocôndria (KOPPERS et al., 2008).

Por outro lado, *in vivo*, os fluidos do trato reprodutivo da fêmea proporcionam uma variedade de enzimas antioxidantes e pequenas moléculas eliminadores de radicais livres para proteger os espermatozoides (AITKEN et al., 2012b).

No presente estudo também foram associadas a produção de NO e a fertilidade. A literatura reporta que o NO é essencial para a função espermática (LAMPAIO et al., 2014, NISOLI et al., 2006), regula muitos processos mas as vezes é paradoxal sua função (LAMPAIO et al., 2014). Estudos tem mostrado os efeitos positivos e negativos sobre a motilidade espermática, por exemplo, as altas concentrações diminuem a motilidade e a viabilidade espermática (LAMPAIO et al., 2014). Em níveis fisiológicos, o NO participa da capacitação espermática, reação acrossomal e efeito antiapoptótico (WANG et al., 2014, ROESSNER et al., 2010). Mas não tem sido mostrada ligação entre a produção de NO e a mitocôndria espermática, assim como não tem relatado a relação do NO com fertilidade *in vivo*.

As evidências deste estudo mostram que o NO é importante para controlar a produção de espécies reativas mitocondriais e citoplasmáticas, sendo assim um importante mediador do potencial de fertilidade espermática, em conformidade com outros estudos (WANG et al., 2014, LAMPAIO et al., 2014, DOSHI et al., 2012, DE LAMIRANDE et al., 1997). A concentração de NO sobre espermatozoides com membrana íntegra teve correlação com motilidade total ($r=0,39$, $P=0,04$). Este estudo também suporta que há relação entre a produção de NO e qualidade espermática, sendo correlacionado positivamente com PIAIA ($r=0,52$, $P=0,006$).

Coincidindo também com Franco (2013), que relatou em espermatozoides de equino que o oxido nítrico pode funcionar como um captador de radicais livres e inativar o $O_2^{\bullet-}$, mas o excesso pode resultar na geração de ONOO-, um oxidante potente que se descompõe para formar o radical hidroxila (HOONO), que pode causar a peroxidação lipídica por nitrosação.

Aumento da concentração de enzimas relacionadas ao oxido nítrico (proteína quinase A) foi detectada 30 minutos após a capacitação *in vitro*. Incrementos do cGMP também foi

relacionado ao NO. Portanto, o NO é um fator chave para capacitação espermática e reação acrossomal (WANG et al., 2014). Em adição, o NO inibe o dano oxidativo no espermatozoide, como visto nas correlações entre produção de espécies reativas mitocondriais ($r=-0,68$, $P=0,0001$), espécies reativas citoplasmáticas ($r=-0,56$, $P=0,002$) e espécies reativas ao nitrogênio ($-0,57$, $P=0,002$). Coincidindo com o efeito encontrado em espermatozoides de humano (ZHANG et al., 1996; HELLSTROM et al., 1994). A produção de NO em espermatozoides funcionais incrementam rapidamente em condições de capacitação *in vitro*, no entanto, a duração do tempo gasto dessa concentração de NO na fase tardia da capacitação do esperma *in vitro* é curta. Diferente de sêmen anormal demora em alcançar apropriadas concentrações para capacitação assim como a demora em gastar o NO. É especulado que a persistência de NO em espermatozoides íntegros por um tempo prolongado leva a detrimento da viabilidade e função espermática (WANG et al., 2014), neste trabalho também foi demonstrados que afeta os resultados de taxa de prenhez *in vivo*.

Pelos métodos usados neste experimento não foi possível estimar o potencial de fertilidade de uma amostra seminal, devido às fontes de variação, pela heterogeneidade de indivíduos, ejaculados e da amostra seminal, sendo que a falha de alguma característica espermática que levou a baixa fertilidade em determinada amostra de sêmen, pode não estar causando a baixa na fertilidade das outras. Especula-se que os métodos estatísticos disponíveis para predição de fertilidade também não são precisos devido ao modelo juntar as respostas globais da amostra seminal e não individualiza por subpopulações, dificultando encontrar diferenças.

Predizer a prenhez considerando o macho deve incluir muitas mais avaliações além da mitocôndria, entre elas o DNA é o mais relatado como responsável de infertilidade em humanos (AITKEN; CURRY, 2011), a pesar que talvez existam organelas ou mecanismos espermáticos que ainda não tem sido identificados, portanto não são avaliados (AMMAN et al., 2014).

Outra interpretação para a dificuldade de estimar o potencial de fertilidade é devido aos mecanismos que as fêmeas desenvolveram para aceitar ou rejeitar os espermatozoides que atravessam seu trato reprodutivo da fêmea, eliminando a maioria deles, mas fornecendo proteção para os poucos selecionados e privilegiados que chegam na tuba uterina, em torno de 1 a 4% de todos os espermatozoides que foram inseminados (HOLT et al., 2009). Estes critérios de seleção uterinos são rigorosos à população de espermatozoides, portanto se os métodos de avaliação de sêmen *in vitro* pudessem imitar o processo de seleção uterina, a

probabilidade de estimar se o espermatozoides é capaz de fecundar os oócitos seria maior (HOLT et al., 2009).

6.7 CONCLUSÕES

- Os marcadores da função mitocondrial são bons indicadores da função e qualidade espermática e estão associados a fertilidade *in vivo*.
- O MSR, DHEi e DHR são bons preditores da atividade metabólica mitocondrial e são bons preditores do potencial de fertilidade *in vivo*; no entanto, sugere-se que futuros estudos sejam realizados incluindo a quantificação da atividade enzimática antioxidante.
- Determina-se que os espermatozoides com alto potencial de fertilidade são aqueles que ativam seu metabolismo e sinalizam processos intracelulares mediados pela produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

7 ARTIGO 4. SUBPOPULAÇÕES ESPERMÁTICAS DEFINIDAS PELA MORFOMETRIA DA CABEÇA DO ESPERMATOZOIDE EM SÊMEN DE TOUROS COM ALTA E BAIXA FERTILIDADE

7.1 INTRODUÇÃO

A avaliação do formato do espermatozoide é uma das avaliações convencionais mais importantes dentro do exame andrológico de qualquer espécie, realizada rotineiramente pelas centrais de coleta e processamento de sêmen ou laboratórios de reprodução como parte do controle de qualidade seminal (ARRUDA et al., 2011), requerido também na determinação do potencial de fertilidade do animal. A população espermática de um determinado ejaculado é heterogênea por natureza, existindo diferença entre touros, entre ejaculados do mesmo touro e na mesma amostra coletada existem populações com diferente estrutura e graus de funcionalidade (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2003; GARCÍA-ÁLVAREZ et al., 2014). A heterogeneidade do ejaculado é notada em diferentes aspectos, por exemplo, quando avaliada a motilidade já foram relatadas subpopulações em relação aos características cinéticos (MUIÑO et al., 2008; 2009). Existem subpopulações espermáticas agrupadas pela integridade de membranas e potencial mitocondrial determinadas pelo uso de sondas fluorescentes (CELEGHINI et al., 2007). Igualmente, tem-se evidenciado na análise morfométrica a presença de subpopulações espermáticas distribuídas de acordo com a dimensão e formato da cabeça (RUBIO-GUILLÉN et al., 2007; SANTOS, 2016b; VALVERDE et al., 2016).

As variações morfométricas encontradas no ejaculado refletem as mudanças que sofreu o espermatozoide durante a espermatogênese e a maturação no epidídimo, também podem ser reflexo dos danos que sofrem as células durante a criopreservação (RUBIO-GUILLÉN et al., 2007). Durante a formação no testículo as células espermátogoniais passam por diferentes estágios até diferenciarem em espermatozoides altamente especializados principalmente por compactar seu DNA para transportá-lo íntegro até a fertilização. Mudanças da morfologia espermática podem relatar a condição dos túbulos seminíferos e do epidídimo e indicar alteração do DNA espermático, instabilidade da cromatina e danos no plasmalema pelo estresse osmótico (LUCIO et al., 2014).

A origem destas subpopulações não é bem esclarecida, mas existe influência de genes atuando durante a espermatogênese e influenciando na anatomia do espermatozoide (RUBIO-

GUILLÉN et al., 2007). Na análise morfométrica, a área do espermatozoide é a característica mais informativa (VALVERDE et al., 2016). Também foi relatado que a criopreservação leva a mudanças da morfometria (ARRUDA, 2000; GRAVANCE et al., 1998; RUBIO-GUILLÉN et al., 2007), caracterizada pela diminuição da subpopulação de espermatozoides com a cabeça grande e longa e aumento da subpopulação caracterizada por espermatozoides com menores dimensões da cabeça, isto devido a maior compactação da cromatina. Alguns eventos, principalmente os de natureza patológica, se constituem como potenciais fontes de diferenciação na morfometria e, portanto, de fertilidade espermática (ARRUDA, 2000). Em adição, a distribuição de frequência de espermatozoides dentro de cada subpopulação após a criopreservação varia entre machos (RUBIO-GUILLÉN et al., 2007). Mostrando que alguns indivíduos são mais sensíveis a criopreservação, sendo um bom marcador do potencial de congelabilidade.

Segundo as pesquisas recentes, a heterogeneidade das subpopulações espermáticas tem relevância funcional, principalmente com relação à fertilidade (YÁNIZ et al., 2016). O potencial de fertilidade do macho depende da heterogeneidade do ejaculado interagindo com o trato reprodutivo da fêmea em diferentes níveis (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2003, CURRY, 2000).

Quando o estudo da fertilidade em relação às características espermáticas tem como base a média dos valores e considera o ejaculado como uma amostra homogênea perde-se a capacidade de predição (YÁNIZ et al., 2015). Assim, a identificação de subpopulações conduzida pela associação de análises computadorizadas e métodos estatísticos multiparamétricos e análises discriminatórias para agrupar os espermatozoides pela similaridade morfométrica podem trazer mais informações da relação entre fertilidade e qualidade espermática (YÁNIZ et al., 2016). Touros com alta fertilidade produzem mais espermatozoides alongados e cônicos; no entanto, estas variações não são fáceis de ser identificadas pelo olho humano (VALVERDE et al., 2016). A relação entre morfometria da cabeça e fertilidade tem sido relatada em bovinos (VALVERDE et al., 2016; SANTOS, 2016; GRAVANCE et al., 2009; BELLETI et al., 2005); entretanto, não existem estudos que correlacionem a fertilidade a campo de touros usados na IATF com as subpopulações morfométricas do sêmen, nem sua determinação como preditor de fertilidade. Este estudo teve o objetivo de classificar no ejaculado de touros subpopulações pela morfometria espermática e identificar variações destas subpopulações em partidas de sêmen com escore de fertilidade alto e baixo, esperando um marcador de subfertilidade a campo associado à variação do tamanho da cabeça do espermatozoide.

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

7.2.1 Partidas de sêmen e processamento do sêmen

Foram utilizadas 13 partidas de sêmen de seis touros da raça Aberdeen Angus procedentes de uma central de coleta e processamento de sêmen, sendo três animais considerados como de alta fertilidade e três como de baixa fertilidade. De acordo com o índice de fertilidade de cada touro, as partidas foram separadas em dois grupos: um grupo de alta fertilidade pelos escores de 0,536; 0,495 e 0,284 (n=7) e baixa fertilidade, pelos escores: -1,579, -1,758 e -2,447) (n=6). O índice de fertilidade do touro foi baseado em dados prévios de fertilidade a campo, usando softwares específicos e baseado em fatores reprodutivos, fatores ambientais e fatores de gerenciamento de rebanho (estação de monta, fase reprodutiva da fêmea, ECC, inseminador, intervalo pós-parto, entre outros) que influenciam o desempenho de fertilidade dos reprodutores. A previsão da fertilidade de cada touro foi obtida e expressa como a percentagem de desvio da sua taxa de concepção em relação à taxa média de concepção de todos os touros.

7.2.2 Preparação da amostra para análise morfométrica

As partidas de sêmen foram descongeladas em banho-Maria (37°C/30 segundos) e uma amostra foi diluída e fixada em formol salino 4% (pré-aquecido a 37° C), sendo mantida refrigerada até a análise. Para a aquisição das imagens, foi preparada uma câmara úmida, resumidamente, foi depositada uma gota de 2,5 µL em uma lâmina coberta com uma lamínula (22x22 mm) que se espalha pela lamínula para formar uma camada fina de células no mesmo plano. Foram adquiridas imagens de 200 espermatozoides de cada partida, aleatoriamente em diferentes campos, rejeitando aqueles espermatozoides com partículas ou interferências. Utilizando um microscópio de contraste de fase, com filtro verde, no aumento de 1000x (Modelo Eclipse E200, Nikon ®) e uma câmara de vídeo digital (Modelo Eureka 5,0, USB 5M USB 2,0 2592 X 1944 pixel) conectada ao computador para armazenamento das imagens em formato “bmp”.

7.2.3 Processamento das imagens no Image J

Foram processadas as imagens de cada uma das cabeças espermáticas de cada amostra até completar 200 mensurações usando o *software* Image J (*National Institutes of Health - NIH*). Cada imagem foi aberta no programa e em seguida foi realizada a mensuração da distância de 0,1 mm na régua que foi fotografada juntamente com a imagem, para a escolha da escala em milímetros (23880,07 pixel/milímetro), por meio da ferramenta “*Straight line selection*” e a opção “*Set scale*”. Posteriormente, cada cabeça espermática foi selecionada usando a ferramenta retangular da barra de ferramentas do Image J (Figura 13). Cada imagem foi convertida ao formato de 8 bits, que é a escala de cinzas, após foi utilizada a ferramenta “*Threshold*” para converter a imagem em pixels para delimitar o contorno da célula, assim foi possível usando a ferramenta “*Wand (tracing) tool*” delimitar o contorno da cabeça espermática e realizar as mensurações escolhendo previamente as medidas a serem realizadas (Imagem 14). Todos estas características foram salvos no formato Excel (Microsoft Corporation®).

Figura 13 – Interfase da barra de ferramentas do programa Image J mostrando a ferramenta de seleção

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

Figura 14 – Conjunto de mensurações para a análise morfométrica da cabeça do espermatozoide

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

As características do conjunto de mensurações que oferece o Image J para serem determinados foram: Área de seleção em pixels (Área, pixel), média das coordenadas X e Y de todos os pixels da cabeça dos espermatozoides (Centroide), média ponderada de brilho das coordenadas X e Y de todos os pixels da imagem ou seleção (Centro de massa), comprimento do limite externo da seleção (Perímetro, pixel), retângulo envolvendo a imagem selecionada (Retângulo), largura e altura, respectivamente, sendo estas as coordenadas do canto superior esquerdo do retângulo, os principais eixos da elipse traçada na cabeça dos espermatozoides (eixos da elipse), largura: (W, pixels), comprimento: (L, pixel) e circularidade (Circ, pixel).

7.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os características fornecidos pelo Image J foram submetidos à análise de variância de componentes principais e análise de correlação de Pearson, com nível de significância $p \leq 0,05$

para escolher as variáveis mais explicativas e evitar a redundância entre elas. A construção dos agrupamentos foi por métodos hierárquicos, utilizou-se a ferramenta do SAS chamada FATSCLUS que realiza uma análise de agrupamento disjunto com base em distâncias calculadas a partir das variáveis quantitativas (*K-means*). Foram utilizados em 2841 espermatozoides pertencentes de 6 touros, sendo avaliadas 13 partidas de sêmen divididas em alto escore de fertilidade (n=7) e partidas e baixo escore de fertilidade (n=6). Por touro, foram analisados mínimo 1 e máximo 3 partidas de sêmen. O procedimento FASTCLUS usa distâncias euclidianas, então os centros de cluster são baseados na estimativa de mínimos quadrados. O número ótimo de clusters foi determinado a partir da análise de comportamento do nível de similaridade e distância nos vários passos do agrupamento. À medida que se avança, nos vários passos do agrupamento, a similaridade entre os conglomerados decresce e a distância aumenta.

Foram criados gráficos de dispersão envolvendo as médias canônicas (Can) para discriminar visualmente as subpopulações entre grupos de alta e baixa fertilidade e um gráfico individual por touro. As variáveis canônicas determinam as combinações lineares das características morfométricas denominadas variáveis canônicas de tal forma que a correlação entre essas variáveis seja nula.

O SGPLOT do SAS foi utilizado para criar os gráficos para cada animal, considerado uma observação independente. Após a criação dos clusters para cada animal, foi utilizado o procedimento PROC MIXED, para fazer inferências de cada característica avaliado. O modelo contemplou os efeitos fixos de classe de fertilidade, cluster e a interação de classe fertilidade x cluster, além dos efeitos aleatórios de animal e resíduo. Em caso de efeitos significativos, foi adotado o Teste de Tukey como procedimento de comparações múltiplas.

7.4 RESULTADOS

As variáveis incluídas foram a área, perímetro, altura e circunferência da cabeça do espermatozoide, uma vez que estas variáveis explicavam mais que 80% da variação.

Realizando correlação de Pearson para todas as variáveis (APÊNDICE E), das 12 variáveis que são proporcionadas pelo Imagem J, foram utilizadas 5 variáveis mais explicativas dos dados: Área, Perímetro, Largura, Comprimento e Circunferência da cabeça

do espermatozoide. Foi encontrado que a área explicava 80% da variância dos dados ($R^2=0,836527$). Assim, foram encontradas 4 subpopulações (SBP).

Os valores da média e erro padrão (médias $\pm$ EP) determinados da área da cabeça espermática em cada SP foram: SBP1: 27961,10 $\pm$ 63819 pixels; SBP2: 25590,77 $\pm$ 892,94 pixels; SBP3: 30419,30 $\pm$ 1108,84 pixels e SBP4: 20917 $\pm$ 2506,48 pixels.

Foram analisados os 3 touros de baixa e 3 touros de alta fertilidade, para cada grupo foram descritas as frequências e médias dos valores para as 5 características escolhidas (Tabelas 40 e 41).

Tabela 40 – Descrição da média ($\pm$ Erro padrão) das variáveis para cada subpopulação espermática (SBP1, SBP2, SBP3 e SBP4) no grupo de partidas de sêmen de touros de Alta fertilidade

	Frequência n (%)	Área (pixel ²)	Perímetro (pixel)	Amplitude (pixel)	Altura (pixel)	Circunferência (pixel)
SBP1	523 (42,31%)	28175,40 ($\pm$ 646,63)	795.44533($\pm$ 54.02)	204,20 ($\pm$ 4,79)	215,30 ($\pm$ 43,00)	0,567 ($\pm$ 0,080)
SBP2	392 (31,72%)	25929,27 ($\pm$ 869,73)	779.04686($\pm$ 53.29)	193,69 ($\pm$ 2,88)	213,47 ($\pm$ 40,50)	0,544 ($\pm$ 0,078)
SBP3	280 (22,65%)	30576,96 ($\pm$ 1120,59)	817.721($\pm$ 5 8.84)	214,79 ($\pm$ 5,08)	218,37 ($\pm$ 44,05)	0,583 ($\pm$ 0,084)
SBP4	41 (3,32%)	20400,26 ($\pm$ 3023,96)	665.67012($\pm$ 90.01)	171,90 ($\pm$ 4,29)	183,53 ($\pm$ 46,20)	0,592 ($\pm$ 0,119)

Fonte: Florez-Rodriguez (2017).

Tabela 41 – Descrição da média ($\pm$ Erro padrão) das variáveis para cada subpopulação espermática (SBP1, SBP2, SBP3 e SBP4) no grupo de partidas de sêmen de touros de Baixa fertilidade

	Frequência n (%)	Área (pixel ²)	Perímetro (pixel)	Amplitude (pixel)	Altura (pixel)	Circunferência (pixel)
SBP1	537 (43,13%)	28025,08 ($\pm$ 703,84)	766.99 ($\pm$ 62.60)	217,49 ($\pm$ 45,73)	217,49 ($\pm$ 43,743)	0,6103 ($\pm$ 0,099)
SBP2	358 (28,75%)	25531,79 ($\pm$ 892,82)	737.44 ($\pm$ 53.14)	199,87 ($\pm$ 43,72)	205,82 ($\pm$ 45,01)	0,5983 ($\pm$ 0,0836)
SBP3	269 (21,61%)	30482,42 ($\pm$ 1075,42)	811.53 ($\pm$ 77.18)	208,31 ($\pm$ 44,04)	225,26 ($\pm$ 41,89)	0,5953 ($\pm$ 0,1054)
SBP4	81 (6,5%)	21416,92 ($\pm$ 2118,66)	654.95 ($\pm$ 59.03)	188,40 ($\pm$ 44,77)	185,06 ($\pm$ 41,28)	0,6359 ($\pm$ 0,0943)

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

A determinação das subpopulações foi feita para cada touro, mostrando que a SBP4 aumentava a frequência em partidas de menor fertilidade e a frequência da SBP1 foi maior nos touros de alta fertilidade (Tabela 42).

Tabela 42 – Descrição da frequência de cada subpopulação espermática (SBP1, SBP2, SBP3 e SBP4) e as médias (pixels) das variáveis escolhidas por partida de sêmen criopreservadas de touros

Touro	Escore	Frequência (n,%)				ÁREA (pixel ²)	AMP (pixel)	CIR (pixel)
		SBP1	SBP2	SBP3	SBP4			
M	0,536	170 (47,1)	12 (3,3)	176 (48,8)	3 (0,8)	2519	43,10	0,07
N	0,495	250 (51,4)	100 (20,6)	133 (27,4)	3 (0,6)	1984	42,20	0,07
O	0,284	45 (11,6)	174 (44,7)	154 (39,6)	16 (4,1)	2266	43,77	0,07
P	-1,579	274 (45,9)	145 (24,3)	155 (26,0)	23 (3,8)	2182	40,20	0,09
Q	-1,758	25 (10,5)	122 (51,3)	1 (0,4)	90 (37,8)	2247	44,21	0,11
R	-2,447	123 (30)	206 (50,2)	9 (2,2)	72 (17,6)	2719	49,23	0,06

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

Legenda: Escore: Escore de fertilidade, PER: Perímetro, AMP: Amplitude, ALT: Altura, CIR: Circunferência

Para alta fertilidade foram observadas a distribuição e a ordem das SBPs, a maior população é SBP3, seguido pela SBP1, SBP4 e SBP2. Para baixa fertilidade a ordem das SBP, foi a maior população é SBP3, seguido pela SBP1, SBP2 e SBP4 (Figura 15). A dispersão das subpopulações é diferente entre touros. Os de alto escore de fertilidade tinham as SBPs mais agrupadas do que o de baixo escore de fertilidade (Figura 16).

Figura 15 – Dispersão das subpopulações das duas primeiras variáveis canônicas (Can 1 e 2) **A.** Descrição das subpopulações (cluster) do grupo de alto escore de fertilidade (FERT=A): SBP1 (vermelho), SBP2 (marrom), SBP3 (azul) e SBP4 (verde) **B.** Descrição das subpopulações (cluster) do grupo de baixo escore de fertilidade (FERT=B): SBP1 (vermelho), SBP2 (verde), SBP3 (azul) e SBP4 (marrom)

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

Figura 16 – Dispersão das subpopulações das duas primeiras variáveis canônicas (Can 1 e 2) para cada touro, mostrando uma cor diferente para cada subpopulação (Cluster)

Touro M: Escore: 0,536

Touro O: Escore: 0,284

Touro P: Escore: -1,579

Touro Q: Escore: -1,758

Touro R: Escore: -2,447

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

O resultado das características morfológicas dentro de cada SBPs é descrito na tabela 43. A comparação entre o grupo de baixo escore e alto escore de fertilidade mostrou as diferenças na área e na altura da cabeça espermática.

Com respeito à área, o grupo de alta fertilidade apresentou 4 subpopulações diferentes, sendo que a SBP3 foi a de área maior e o SBP4 a área menor. O Grupo de baixa mostrou 4 SBPs, no entanto a área para SBP1 e SBP2 foram similares, diferindo da SBP3 e SBP4. A SBP4 é a população com a menor área, igual o grupo de alta fertilidade (Tabela 43). Houve variação entre a área da SBP4 de alta fertilidade ($21564 \pm 728,93$ pixels) comparado com a SBP4 de baixa fertilidade ($27000 \pm 616,71$ pixels), o perímetro e a circunferência foram iguais para os grupos alta e baixa, altura foi maior para a SBP4 do grupo baixa fertilidade ($P=0,0033$).

Tabela 43 – Descrição da média ($\pm$ Erro padrão) da distribuição das subpopulações espermáticas (SBP1, SBP2, SBP3 e SBP4) para cada característica (Área, Perímetro, Altura, Circunferência), dentro de cada subpopulação (*cluster*) para os grupos de partidas de sêmen criopreservado bovino de alto e baixo escore de fertilidade (Escore)

	ALTA FERTILIDADE	BAIXA FERTILIDADE	Valor de P
ÁREA (pixel²)			
SBP1	27092 ($\pm 606,87$) ^{Aa}	27373 ($\pm 608,74$) ^{Ba}	<,0001*
SBP2	26199 ($\pm 611,72$) ^{Ba}	27410 ($\pm 606,07$) ^{Ba}	<,0001*
SBP3	29719 ($\pm 606,08$) ^{Ca}	29629 ($\pm 623,22$) ^{Aa}	<,0001*
SBP4	21564 ($\pm 728,93$) ^{Db}	27000 ($\pm 616,71$) ^{Ca}	<,0001*
Valor de P	<.0001	<.0001	
PERÍMETRO (pixel)			
SBP1	795.44533 ($\pm 54,02$) ^{Aa}	766.99 ($\pm 62,60$) ^{Aa}	0,5306
SBP2	779.04686 ($\pm 53,29$) ^{Aa}	737.44 ($\pm 53,14$) ^{ABa}	0,1253
SBP3	817.721 ($\pm 58,84$) ^{Ba}	811.53 ($\pm 77,18$) ^{Ba}	0,8612
SBP4	665.67012 ($\pm 90,01$) ^{Aa}	654.95 ($\pm 59,03$) ^{Aa}	0,1288
Valor de P	<.0001	<.0001	
ALTURA (pixel)			
SBP1	214,72 ($\pm 3,58$) ^{Aa}	212,96 ($\pm 3,71$) ^{ABa}	0,733
SBP2	212,21 ($\pm 3,97$) ^{Aa}	212,17 ($\pm 3,52$) ^{ABa}	0,9941
SBP3	217,45 ($\pm 3,53$) ^{Aa}	217,82 ($\pm 4,74$) ^{Aa}	0,9501
SBP4	175,37 ($\pm 9,75$) ^{Bb}	206,79 ($\pm 4,35$) ^{Ba}	0,0033*
Valor de P	<.0001	<.0001	
CIRCUNFERÊNCIA (pixel)			
SBP1	0,5666 ($\pm 0,023$) ^{Ba}	0,6172 ($\pm 0,023$) ^{Ba}	0,1311
SBP2	0,5661 ($\pm 0,023$) ^{Ba}	0,6105 ($\pm 0,023$) ^{BCa}	0,1864
SBP3	0,5648 ($\pm 0,02$) ^{Ba}	0,5958 ($\pm 0,024$) ^{Ca}	0,3612
SBP4	0,6092 ($\pm 0,029$) ^{Aa}	0,6355 ($\pm 0,024$) ^{Aa}	0,4894
Valor de P	<.0001	<.0001	

Fonte: Florez-Rodriguez (2017)

^{ab} Letras minúscula diferentes na mesma linha indicam diferença significativa ($P < 0,05$) no teste de Tukey.

^{AB} Letras maiúscula diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$) no teste de Tukey.

7.5 DISCUSSÃO

Embora a origem e a fisiologia dessas subpopulações não sejam claras, acredita-se que a diferença das células ocorra por influência genética durante a espermatogênese, e modificação da estrutura durante maturação, uma vez que há a presença de espermatozoides com idades diferentes no epidídimo (ABAIGAR et al., 1999; MARTINS; SOUZA; TRAUTWEIN, 2017).

O ejaculado é uma amostra heterogênea de espermatozoides, com diferente motilidade, morfometria e capacidade fecundante (MARTÍNEZ-PASTOR et al., 2009; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2013). Agrupamento de espermatozoides com características similares forma uma subpopulação dentro da população espermática. Esta diferenciação pode ajudar a entender as mudanças da função espermática entre espermatozoides do mesmo ejaculado, assim como determinar o potencial de fertilidade de uma amostra seminal heterogênea (MARTÍNEZ-PASTOR et al., 2009).

Considerando a correlação entre todas as variáveis da morfometria, encontrou-se que a área representa a característica que mais tem variação e explica as diferenças entre as subpopulações, as outras variáveis foram redundantes na avaliação por clusters.

A subpopulação de menor frequência foi a SBP4, no entanto, foi a subpopulação que trouxe maiores informações a respeito da variação morfométrica da cabeça dos espermatozoides. A área e a altura da SBP4 é maior no grupo de baixa fertilidade, o qual indica que esta subpopulação representa um bom indicador de baixa fertilidade.

Por sua vez, a SBP4 foi encontrada em 3,31% da população de alta fertilidade e 6,50% na população de baixa fertilidade. Embora essa porcentagem seja baixa, pode estar indicando a porcentagem de espermatozoides com danos do DNA, sabendo que a cabeça contém todo o material genético do espermatozoide. Sobre isso, Roy et al. (2012) demonstraram que valores de fragmentação do DNA entre 7 e 10% para sêmen criopreservado de Holstein interferiam no sucesso da IA.

A relação entre a morfometria da cabeça espermática e fertilidade do touro foi claramente encontrada por Valverde et al. (2016), indicando que os touros com alta fertilidade produzem mais espermatozoides alongados e cônicos. Similares resultados foram encontrados por Oliveira et al. (2012). Esses autores confirmam trabalhos anteriores que afirmam que sutis diferenças da cabeça do espermatozoide podem ser detectadas pelas análises de morfometria de touros com diferente fertilidade, que não foram detectados pelas

técnicas convencionais de avaliação morfológica (OSTERMEIER et al., 2001). Resultados semelhantes foram reportados por Santos (2016), quem demonstrou que a maior proporção relativa de SBP4 interfere negativamente na fertilização *in vitro*, usando um modelo de regressão linear demonstrou que à medida que a proporção relativa de células em SBP4 aumenta, a taxa de formação de pronúcleos diminui.

Uma possível explicação para que a maior proporção de SBP4 com maior área de cabeça leve a menor fertilidade é pela menor quantidade de protaminas presentes, estas formam estruturas toroidais que permitem que o DNA espermático alcance maior compactação (MILLER; BRINKWORTH; ILES, 2010). No entanto, protaminação inadequada faz com que o DNA fique mais susceptível à fragmentação resultando em menor compactação nuclear e consequente falha no momento da fertilização (SIMOES et al., 2009).

7.6 CONCLUSÕES

- A análise de subpopulações espermáticas pode ser aplicada ao estudo da função espermática em relação ao índice de fertilidade.
- As análises multivariadas por *cluster* permitem discriminar a presença de subpopulações espermáticas com variação na morfometria da cabeça.
- A subpopulação SBP4 está associada com fertilidade e diminuição do sucesso da fertilidade a campo.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O impacto do sêmen sobre a fertilidade continua sendo de interesse e as pesquisas em torno deste assunto são necessárias para compreender melhor as limitações que ainda existem na reprodução. Desta pesquisa foi verificado que a qualidade espermática determina o potencial de fertilidade, assim, o uso de sêmen de alta qualidade melhora os resultados de taxa de prenhez dentro de um programa de IATF. Portanto, para alcançar uma maior eficiência reprodutiva devem ser rejeitadas partidas que tem baixa qualidade e comercializar unicamente as partidas de alta qualidade. Quando se associam mais técnicas de avaliação espermática se obtém melhor predição do potencial de fertilidade de uma partida de sêmen, tornando possível identificar danos sutis do espermatozoide que não foram detectados pelas análises convencionais.

O primeiro fator limitante é que a análise convencional não explica todos os resultados de fertilidade a campo, mas é uma ferramenta primordial para eliminar partidas de baixo potencial de fertilidade. O segundo fator limitante é que a fertilidade é um processo multifatorial. O terceiro fator limitante é a rigorosidade das técnicas e a necessidade de equipamentos de alto custo para as análises objetivas do sêmen. O quarto fator limitante e que ainda precisa ser estudado é que, a habilidade de fecundar será propriamente adquirida no ambiente uterino, onde o espermatozoide ativa seu metabolismo para realizar o processo de fecundação, o que faz que a avaliação espermática *in vitro* não detecte o verdadeiro potencial de fertilidade do sêmen.

O espermatozoide é uma célula altamente especializada, assim muitos processos da sua função ainda não tem sido bem definidos, incluindo o impacto sobre a fertilidade. Desta forma, novas abordagens do espermatozoide por métodos mais sensíveis de avaliação seminal como as sondas fluorescentes seja por microscopia de epifluorescência ou citometria de fluxo oferecem mais informações para juntar com as análises convencionais para o diagnóstico da qualidade espermática e predição do potencial de fertilidade.

O uso de sondas fluorescentes permite novos enfoques de estudo facilitando análises simultâneas e combinações de fluoróforos para avaliar diferentes estruturas, compartimentos, funções para identificar as populações elite que teriam maior chance de alcançar o oócito e completar o processo de fertilização. Essa abordagem de múltiplas análises é necessária para determinar as características que possui um espermatozoide com alto potencial de fertilidade, ainda mais dentro de um ejaculado que apresenta fisiologicamente heterogeneidade de

populações espermáticas. A heterogeneidade do sêmen bovino, refletida na presença de subpopulações espermáticas com boa e má qualidade, em porcentagens que variam entre touros e entre partidas do mesmo touro, geram confusão na resposta de algumas análises, portanto sugere-se mais estudos para encontrar a importância destas subpopulações.

Talvez seria interessante adicionar análises no tempo, entre 2 a 4 horas após a descongelação e mantidos a 37°C. Isto imita a exposição ao trato reprodutivo feminino e facilita a detecção de anomalias latentes do espermatozoide, que pode não ser aparente imediatamente após a descongelação.

A avaliação da produção de espécies reativas permitiu determinar que a função mitocondrial é um pré-requisito para o aumento da fertilidade. Principalmente pela produção de ROS e RNS necessários para garantir os processos de capacitação, hiperativação, reação acrossomal e metabolismo; no entanto, a sensibilidade ao dano oxidativo vai depender dos mecanismos de proteção antioxidante para regular o balanço das concentrações de espécies reativas. Portanto, sendo a mitocôndria a organela no comando de diferentes funções espermáticas e dado que vários biomarcadores mitocondriais se relacionaram com maior fertilidade, que sugere mais importante que o estudo mais aprofundado da mitocôndria espermática (produção de espécies reativas e antioxidantes) poderia explicar melhor o potencial de fertilidade.

Finalmente, a avaliação por subpopulações mostrou dados relevantes sobre a heterogeneidade de populações espermáticas com diferentes potenciais de fertilidade. Assim, indicamos que populações específicas no ejaculado interferem no processo de fecundação, e possivelmente também no desenvolvimento embrionário, mas reforça-se a necessidade de mais análises deste tipo.

9 REFERÊNCIAS

- ABAIGAR, T.; HOLT, W. V.; HARRISON, R. a; DEL BARRIO, G. Sperm subpopulations in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. **Biology of Reproduction**, v. 60, n. 1, p. 32–41, jan. 1999.
- ABDEL-AZIM, G. Effect of synchronization and semen sorting on artificial insemination bull fertility. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 420–425, 2010.
- AITKEN, R. J. The capacitation-apoptosis highway: oxysterols and mammalian sperm function. **Biology of Reproduction**, v. 85, n. 1, p. 9–12, jul. 2011.
- AITKEN, R. J.; BAKER, M. A. Oxidative stress, sperm survival and fertility control. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 250, n. 1–2, p. 66–69, 2006.
- AITKEN, R. J.; CURRY, B. J. Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 14, n. 3, p. 367–81, 1 mar. 2011.
- AITKEN, R. J.; DE IULIIS, G. N.; GIBB, Z.; BAKER, M. A. The Simmet lecture: new horizons on an old landscape--oxidative stress, DNA damage and apoptosis in the male germ line. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. Suppl 4, p. 7–14, 2012.
- AITKEN, R. J.; GIBB, Z.; MITCHELL, L. a; LAMBOURNE, S. R.; CONNAUGHTON, H. S.; DE IULIIS, G. N. Sperm motility is lost in vitro as a consequence of mitochondrial free radical production and the generation of electrophilic aldehydes but can be significantly rescued by the presence of nucleophilic thiols. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 5, p. 110, nov. 2012b
- AL NAIB, A.; HANRAHAN, J. P.; LONERGAN, P.; FAIR, S. *In vitro* assessment of sperm from bulls of high and low field fertility. **Theriogenology**, v. 76, n. 1, p. 161–7, 1, 2011.
- AM-IN, N.; KIRKWOOD, R. N.; TECHAKUMPHU, M.; TANTASUPARUK, W. Lipid profiles of sperm and seminal plasma from boars having normal or low sperm motility. **Theriogenology**, v. 75, n. 5, p. 897–903, 2011.
- AMANN, R. P. Seminal Can Sample the Fertility Be Predicted Potential of a Accurately?. **Journal of Andrology**, v. 10, n. 2, p. 89–98, 1989.
- AMANN, R. P.; HAMMERSTEDT, R. H. *In vitro* evaluation of sperm quality: An opinion. **Journal of Andrology**, v. 14, n. 6, p. 397–406, 1993.
- AMANN, R. P.; HAMMERSTEDT, R. H. Detection of Differences in Fertility Andrology Lab Corner. **Journal of Andrology**, v. 23, n. 3, p. 317–325, 2002.
- AMANN, R. P.; WABERSKI, D. Theriogenology Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. **Theriogenology**, v. 81, n. 81, p. 5–17, 2014.
- AMARAL, A.; LOURENÇO, B.; MARQUES, M.; RAMALHO-SANTOS, J. Mitochondria functionality and sperm quality. **Reproduction**, v. 146, p. 163–174, 2013.
- AMARAL, A.; RAMALHO-SANTOS, J. Assessment of mitochondrial potential: Implications for the correct monitoring of human sperm function. **International Journal of Andrology**, v. 33, n. 1, p. 180–186, 2010.

- ANUALPEC. Anuário da Pecuária Brasileira. São Paulo. FNP Informa Economics. 2015.
- ANZAR, M.; HE, L.; BUHR, M. M.; KROETSCH, T. G.; PAULS, K. P. Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 2, p. 354–360, 2002.
- ANGRIMANI, D. S. R.; LOSANO, J. D. A.; RUI, B. R.; BICUDO, L. C.; ANDRADE, A. F.; ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C. Ferramentas para avaliação da funcionalidade da mitocôndria espermática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, n. 2, p. 277–283, 2015.
- ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C.; ALONSO, M. A.; CARVALHO, H. F.; OLIVEIRA, L. Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D. F.; AFFONSO, F. J.; LEMES, K.; JAIMES, J. D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 19, p. 145–151, 2011.
- ARRUDA, R. P.; DE ANDRADE, A. F. C.; PERES, K. R.; FERNANDES, C.; NASCIMENTO, J.; CELEGHINI, E. C. C. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 17, p. 8–16, 2007.
- ASBIA. Associação Brasileira de Inseminação Artificial. Exportações de sêmen bovino devem dobrar nos próximos anos. <http://www.asbia.org.br/novo/imprensa/>
- BARUSELLI, P. S. IATF supera dez milhões de procedimentos e amplia o mercado de trabalho. **Revista CFMV**, p. 57–61, 2016.
- BATTUT, I. B. Development of a new fertility prediction model for stallion semen, including flow cytometry. **Theriogenology**, v. 86, n. 4, p. 1111–1131, 2016.
- BELETTI, M. E.; COSTA, L. F.; GUARDIEIRO, M. M. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. **Brazilian Journal Morphology Science**, v. 22, p. 85–90, 2005.
- BERLINGUER, F.; MADEDDU, M.; PASCIU, V.; SUCCU, S.; SPEZZIGU, A.; SATTA, V.; MEREU, P.; LEONI, G. G.; NAITANA, S. Semen molecular and cellular features: these parameters can reliably predict subsequent ART outcome in a goat model. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 7, n. 1, p. 125, 2009.
- BISSONNETTE, N.; LÉVESQUE-SERGERIE, J.-P.; THIBAUT, C.; BOISSONNEAULT, G. Spermatozoal transcriptome profiling for bull sperm motility: a potential tool to evaluate semen quality. **Reproduction**, v. 138, n. 1, p. 65–80, 2009.
- BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bulls spermiogram. **Nordisk Veterinar medicin.**, v. 25, n. 7, p. 383–391, 1973.
- BÓ, G. A.; CUTAIA, L. L. **Implementación de programas de inseminación artificial en rodeos de cría**. In: Argentina. Memorias del VI Simposio Internacional de Reproducción Animal. Instituto de Reproducción Animal de Córdoba Argentina. 2005. p. 326–332.
- BRITO, L. F. C.; BARTH, A. D.; BILODEAU-GOESEELS, S.; PANICH, P. L.; KASTELIC, J. P. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. **Theriogenology**, v. 60, n. 8, p. 1539–1551, 2003.
- BRITO, L. F. C. **Variations in laboratory semen evaluation procedures and testing**. In: Proc Tech Conf Artif Insem and Reprod. 2010.

- BROUWERS, J. F. H. M.; GADELLA, B. M. In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 35, n. 11, p. 1382–1391, 2003.
- BROUWERS, J. F.; SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after freeze – thawing. **Theriogenology** 63, 1605-1616, v. 63, p. 458–469, 2005.
- BUZADZIC, B.; VUCETIC, M.; JANKOVIC, A.; STANCIC, A.; KORAC, A.; KORAC, B.; & OTASEVIC, V. New insights into male (in) fertility: the importance of NO. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 6, p. 1455-1467, 2015.
- ÂMARA, D. R.; GUERRA, M. M. P. Mitocôndria espermática: além da síntese de adenosina trifosfato (ATP). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 2, p. 93–99, 2008.
- CARVALHO, J. O.; SARTORI, R.; DODE, M. A. N. Different ways to evaluate bovine sexed sperm *in vitro*. **Animal Reproduction**, v. 11, n. 3, p. 199–206, 2014.
- CASTRO, L. S.; DE ASSIS, P. M.; SIQUEIRA, A. F. P.; HAMILTON, T. R. S.; MENDES, C. M.; LOSANO, J. D. A.; NICHI, M.; VISINTIN, J. A.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A. Sperm oxidative stress is detrimental to embryo development: A dose-dependent study model and a new and more sensitive oxidative status evaluation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016,
- CBRA. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. ed. Belo Horizonte, 2013, 104 p.
- CELEGHINI, Eneiva Carla Carvalho. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. p. 188, 2005. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; DE ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, n. 5, p. 479–88, 2007.
- CELEGHINI, E.C.C. ARRUDA, R. P.; DE ANDRADE, A.F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, v. 104, n. 2, p. 119-131, 2008.
- CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; ARRUDA, R. P. Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 3, p. 536–543, 2010
- CHRISTENSEN, P.; BOELLING, D.; PEDERSEN, K. M.; KORSGAARD, I. R.; JENSEN, J. Relationship between sperm viability as determined by flow cytometry and nonreturn rate of dairy bulls. **Journal of Andrology**, v. 26, n. 1, p. 98–106, 2005.
- COCCHIA, N.; PASOLINI, M. P.; MANCINI, R.; PETRAZZUOLO, O.; CRISTOFARO, I.; ROSAPANE, I.; SICA, A.; TORTORA, G.; LORIZIO, R.; PARAGGIO, G.; MANCINI, A. Effect of sod (superoxide dismutase) protein supplementation in semen extenders on motility, viability, acrosome status and ERK (extracellular signal-regulated kinase) protein phosphorylation of chilled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 75, n. 7, p. 1201–10, 2011.

COOPER, T. G.; YEUNG, C.-H. A flow cytometric technique using peanut for evaluating acrosomal loss from human spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 19, n. 5, p. 542–550, 1998.

CORREA, J. R.; PACE, M. M.; ZAVOS, P. M. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. **Theriogenology**, v. 48, n. 5, p. 721–731, 1997.

DAVILA, M. P.; MUÑOZ, P. M.; TAPIA, J. A.; FERRUSOLA, C. O.; DA SILVA C, C. B.; PEÑA, F. J. Inhibition of mitochondrial complex I leads to decreased motility and membrane integrity related to increased hydrogen peroxide and reduced ATP production, while the inhibition of glycolysis has less impact on sperm motility. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–21, 2015.

DE IULIIS, G. N.; WINGATE, J. K.; KOPPERS, A. J.; MCLAUGHLIN, E. a; AITKEN, R. J. Definitive evidence for the nonmitochondrial production of superoxide anion by human spermatozoa. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 91, n. 5, p. 1968–75, maio 2006.

DE LAMIRANDE, E.; LAMOTHE, G. Reactive oxygen-induced reactive oxygen formation during human sperm capacitation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, n. 4, p. 502–510, 2009.

DE LUCIO, A. C.; FERRAUDO, A. S.; DE OLIVEIRA, L. Z.; DO CARMO, A. S.; ALVES, B. G.; ALVES, K. A.; ALMEIDA, S.; DERAGON, L. A.; PEREIRA, W.; CARNEIRO, L. C.; DE LIMA, V. F. M. H. Exploratory analysis of differences in sperm morphology in Nelore and Gir (*Bos indicus*) bulls. **Tropical Animal Health and Production**, v. 46, n. 5, p. 765–770, 2014.

DEJARNETTE, J. M.; NEBEL, R. L.; MARSHALL, C. E. **Understanding estimates of AI sire fertility: From A to Z**. In: 23rd technical conference on artificial insemination & reproduction, Milwaukee, WI. 2010.

DOSHI SB, KHULLAR K, SHARMA RK, AGARWAL A: Role of reactive nitrogen species in male infertility. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 10, n. 1, p. 109, 2012.

FARRELL, P.; FOOTE, R.; M.M, M.; TROUERN-TREND, V.; A.L, T. Media handling and dilution effects computer-assisted procedures on human, tested rabbit, to minimize and bull Sperm Sperm Analysis (CASA). **Journal of Andrology**, v. 17, n. 3, p. 293–300, 1996.

FARRELL, P. B.; PRESICCE, G. A.; BROCKETT, C. C.; FOOTE', R. H. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. **Theriogenology**, v. 49, p. 871–879, 1998.

FATHI, Z.; TAVALAEE, M.; KIANI, A.; DEEMEH, M. R.; MODARESI, M.; NASR-ESFAHANI, M. H. Flow cytometry: a novel approach for indirect assessment of protamine deficiency by CMA3 staining, taking into account the presence of M540 or apoptotic bodies. **International Journal of Fertility & Sterility**, v. 5, n. 3, p. 128, 2011.

FERRAZ, M. A. M. M.; MORATÓ, R.; YESTE, M.; ARCARONS, N.; PENA, A. I.; TAMARGO, C.; HIDALGO, C. O.; MUIÑO, R.; MOGAS, T. Evaluation of sperm subpopulation structure in relation to *in vitro* sperm-oocyte interaction of frozen-thawed semen from Holstein bulls. **Theriogenology**, v. 81, n. 8, p. 1067–1072, 2014.

FEUGANG, J. M.; RODRIGUEZ-OSORIO, N.; KAYA, A.; WANG, H.; PAGE, G.; OSTERMEIER, G. C.; TOPPER, E. K.; MEMILI, E. Transcriptome analysis of bull spermatozoa: Implications for male fertility. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 21, n. 3, p. 312–324, 2010.

FLESCH, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1469, p. 197–235, 2000.

FRENEAU, G. E.; CHENOWETH, P. J.; ELLIS, R.; RUPP, G. Sperm morphology of beef bulls evaluated by two different methods. **Animal reproduction science**, v. 118, n. 2–4, p. 176–81, abr. 2010.

GADELLA, B. M.; LUNA, C. Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 74–84, 1 jan. 2014.

GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; RAMÓN, M.; DEL OLMO, E.; JIMÉNEZ-RABADÁN, P.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; ANEL-LÓPEZ, L.; GARDE, J. J.; SOLER, A. J. Dynamics of sperm subpopulations based on motility and plasma membrane status in thawed ram spermatozoa incubated under conditions that support *in vitro* capacitation and fertilization. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n. 5, p. 725–732, 2014.

GARCÍA, B. M.; MORAN, A. M.; FERNÁNDEZ, L. G.; FERRUSOLA, C. O.; RODRIGUEZ, A. M.; BOLAÑOS, J. M. G.; DA SILVA, C. M. B.; MARTÍNEZ, H. R.; TAPIA, J. a; PEÑA, F. J. The mitochondria of stallion spermatozoa are more sensitive than the plasmalemma to osmotic-induced stress: role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway. **Journal of Andrology**, v. 33, n. 1, p. 105–13, 2012.

GARCIA, A. R. **Efeitos do estresse térmico testicular e do uso da somatotropina recombinante bovina nas características seminais, integridade de membranas, função mitocondrial e estrutura da cromatina de espermatozoides de touros simental (bos taurus taurus)**. 2004. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

GARCÍA, B. M.; MORAN, A. M.; FERNÁNDEZ, L. G.; FERRUSOLA, C. O.; RODRIGUEZ, A. M.; BOLAÑOS, J. M. G.; DA SILVA, C. M. B.; MARTÍNEZ, H. R.; TAPIA, J. A; PEÑA, F. J. The mitochondria of stallion spermatozoa are more sensitive than the plasmalemma to osmotic-induced stress: role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway. **Journal of Andrology**, v. 33, n. 1, p. 105–13, 2012.

GARNER, D. L.; THOMAS, C. A.; GRAVANCE, C. G. The effect of glycerol on the viability, mitochondrial function and acrosomal integrity of bovine spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 34, n. 5, p. 399–404, 1999.

GHAFOURIFAR, P.; SCHENK, U.; KLEIN, S. D.; RICHTER, C.; LETT, C. F.; CHEM, J. B. Mitochondrial Nitric-oxide Synthase Stimulation Causes Cytochrome c Release from Isolated Mitochondria. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 44, p. 31185–31188, 1999.

GIARETTA, E.; MUNERATO, M.; YESTE, M.; GALEATI, G.; SPINACI, M.; TAMANINI, C.; MARI, G.; BUCCI, D. Implementing an open-access CASA software for the assessment of stallion sperm motility : Relationship with other sperm quality parameters. **Animal Reproduction Science**, v. 176, p. 11–19, 2017.

GIBB, Z.; LAMBOURNE, S. R.; AITKEN, R. J. The paradoxical relationship between stallion fertility and oxidative stress. **Biology of Reproduction**, v. 91, n. July, p. 1–10, 2014.

GILLAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 445–457, 2005.

GILLAN, L.; KROETSCH, T.; CHIS MAXWELL, W. M.; EVANS, G. Assessment of *in vitro* sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 103, n. 3–4, p. 201–214, 2008.

GIULIVI, C.; PODEROSO, J. J.; BOVERIS, A. Production of nitric oxide by mitochondria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 18, p. 11038-11043, 1998.

GLIOZZI, T. M.; TURRI, F.; MANES, S.; CASSINELLI, C.; PIZZI, F. The combination of kinetic and flow cytometric semen parameters as a tool to predict fertility in cryopreserved bull semen. **Animal**, p. 1-8, 2017.

GRANT, K. E.; OLIVEIRA, R. V. De; HENNINGTON, B. S.; PERKINS, A. G.; STOKES, J.; ROWE, D.; TOPPER, E.; KAYA, A.; MOURA, A. M. Sperm superoxide dismutase is associated with bull fertility. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, n. 9, p. 1405-1413, 2016.

GRAVANCE, C. G.; VISHWNATH, R.; PITT, C.; GARNER, D. L.; CASEY, P. J. Effects of Cryopreservation on Bull testing. **Journal of Andrology**, v. 19, n. 6, p. 704-709, 1998.

GÜRLER, H.; CALISICI, O.; BOLLWEIN, H. Inter-and intra-individual variability of total antioxidant capacity of bovine seminal plasma and relationships with sperm quality before and after cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, v. 155, p. 99-105, 2015.

GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R. Determination of intracellular reactive oxygen species and high mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using fluorescence-activated flow cytometry. **Journal of Animal Science**, v. 84, n. 8, p. 2089-2100, 2006.

GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R.; LONG, J. A. Mitochondrial function and reactive oxygen species action in relation to boar motility. **Theriogenology**, v. 70, n. 8, p. 1209-1215, 2008.

HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane mammalian spermatozoa integrity. **Journal of reproduction and fertility**, v. 88, p. 343-352, 1990.

HANNICKEL, Adriana et al. Image J como ferramenta para medida da área de partículas de magnetita em três escalas nanométricas. **CIT**, v. 4, p. 16-26, 2002.

HELD, Paul. An introduction to reactive oxygen species-measurement of ROS in cells. BioTek Instruments Inc., **Application Guide**, 2012.

HOELKER, M.; SALILEW-WONDIM, D.; DRILLICH, M.; CHRISTINE, G.-B.; GHANEM, N.; GOETZE, L.; TESFAYE, D.; SCHELLANDER, K.; HEUWIESER, W. Transcriptional response of the bovine endometrium and embryo to endometrial polymorphonuclear neutrophil infiltration as an indicator of subclinical inflammation of the uterine environment. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 24, n. 6, p. 778-93, 2012.

HOLT, W. V. Is quality assurance in semen analysis still really necessary? A spermatologist's viewpoint. **Human Reproduction**, v. 20, n. 11, p. 2983-2986, 2005.

HOLT, W. V.; VAN LOOK, K. J.W. Concepts in sperm heterogeneity, sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality. **Reproduction**, v. 127, n. 5, p. 527-535, 2004.

HOSSAIN, M. S.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; NAGY, S.; SIQUEIRA, A. P.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. **Asian Journal of Andrology**, v. 13, n. 3, p. 406-419, 2011.

JANKOVICOVÁ, J.; ANTALIKOVA, J.; SIMON, M.; MICHALKOVA, K.; HOROVSKA, L. Comparative fluorescence analysis of the bovine sperm using IVA-520 (anti-CD46 antibody) and lectins: probable localisation of CD46 on bovine sperm membrane. **Gen. Physiol. Biophys.**, v. 30, p. 70-76, 2015.

- JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; L, S.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm characteristics post-thaw and response to calcium ionophore in relation to fertility in swedish dairy ai bulls. **Theriogenology**, v. 53, p. 859–875, 2000.
- JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Subtle Membrane Changes in Cryopreserved Bull Semen in Relation with Sperm Viability, Chromatin Structure, and Field Fertility. **Theriogenology**, v. 60, n. 4, p. 743–758, 2003.
- JANUŠKAUSKAS, A.; ŽILINSKAS, H. Bull Semen Evaluation Post-Thaw and Relation of Semen Characteristics To Bull' S Fertility. **Veterinarija Ir Zootechnika**, v. 17, n. 39, 2002.
- KALYANARAMAN, B. Oxidative chemistry of fluorescent dyes : implications in the detection of reactive oxygen and nitrogen species. **Biochem Soc Trans**, v. 39, n. 5, p. 1221–1225, 2011.
- KALYANARAMAN, B. et al. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 1, p. 1-6, 2012.
- KALYANARAMAN, B.; DARLEY-USMAR, V.; DAVIES, K. J. A.; DENNERY, P. A.; FORMAN, H. J.; GRISHAM, M. B.; ROBERTS, J.; MANN, G. E.; MOORE, K.; ISCHIROPOULOS, H. Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. **Free Radic Biol Med**, v. 45, n. 4, p. 1–6, 2013.
- KASTELIC, J. P. Male involvement in fertility and factors affecting semen quality in bulls. **Animal Frontiers**, v. 3, n. 4, p. 20–25, 26 set. 2013.
- KILLIAN, G. J.; CHAPMAN, D. A.; ROGOWSKI, L. A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v. 49, n. 6, p. 1202–7, dez. 1993.
- KOPPERS, A. J.; DE IULIIS, G. N.; FINNIE, J. M.; MCLAUGHLIN, E. a; AITKEN, R. J. Significance of mitochondrial reactive oxygen species in the generation of oxidative stress in spermatozoa. The **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 93, n. 8, p. 3199–3207, 2008.
- KOPPERS, A. J.; GARG, M. L.; AITKEN, R. J. Stimulation of mitochondrial reactive oxygen species production by unesterified, unsaturated fatty acids in defective human spermatozoa. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, n. 1, p. 112–119, 2010.
- KUISMA, P.; ANDERSSON, M.; KOSKINEN, E.; KATILA, T. Fertility of frozen-thawed stallion semen cannot be predicted by the currently used laboratory methods. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 48, p. 14, 2006.
- LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, p. 159-174, 1977.
- LEWIS, S. E. M.; JOHN AITKEN, R.; CONNER, S. J.; IULIIS, G. De; EVENSON, D. P.; HENKEL, R.; GIWERCMAN, A.; GHARAGOZLOO, P. The impact of sperm DNA damage in assisted conception and beyond: recent advances in diagnosis and treatment. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 27, n. 4, p. 325–37, out. 2013.
- LI, Y.; KALO, D.; ZERON, Y.; ROTH, Z. Progressive motility – a potential predictive parameter for semen fertilization capacity in bovines. **Zygote**, p. 1–13, 2014.
- MALAMA, E.; ZERON, Y.; JANETT, F.; SIUDA, M.; ROTH, Z.; BOLLWEIN, H. Theriogenology Use of computer-assisted sperm analysis and flow cytometry to detect seasonal variations of bovine semen quality. **Theriogenology**, v. 87, p. 79–90, 2017.

- MARÍN-GARCÍA, J. Mitochondria and Their Role in Cardiovascular Disease. **Springer Science & Business Media**, p. 13–27, 2012.
- MARQUES, M. de O.; MOROTTI, F.; SILVA, C. B. da; JÚNIOR, M. R.; SILVA, R. C. P.; BARUSELLI, P. S.; SENEDA, M. M. Influence of category - heifers, primiparous and multiparous lactating cows - in a large- scale resynchronization FTAI program. **Journal of Veterinary Science**, v. 16, n. 3, p. 367–371, 2015.
- MARTÍNEZ-PASTOR, F.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; DEL ROCÍO FERNÁNDEZ-SANTOS, M.; DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, a E.; ESTESO, M. C.; GARDE, J. J. DNA status on thawed semen from fighting bull: a comparison between the SCD and the SCSA tests. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. 3, p. 424–31, 2012.
- MARTINS, M. I. M.; SOUZA, A. K. de; TRAUTWEIN, L. G. C. Subpopulações Espermáticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n. 1, p. 243–247, 2017.
- MENDOZA, C.; CARRERAS, A.; MOOS, J.; TESARIK, J. Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by a one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 95, n. 3, p. 755–763, 1992.
- MILLER, D.; BRINKWORTH, M.; ILES, D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. **Reproduction**, v. 139, n. 2, p. 287–301, 2010.
- MISHRA, C.; PALAI, T. K.; SARANGI, L. N.; PRUSTY, B. R.; MAHARANA, B. R. Candidate gene markers for sperm quality and fertility in bulls. **Veterinary World**, v. 6, n. 11, p. 905–910, 2013.
- MOCÉ, E.; GRAHAM, J. K. *In vitro* evaluation of sperm quality. **Animal Reproduction Science**, v. 105, n. 1–2, p. 104–118, 2008.
- MORADO, S.; PEREYRA, V.; BREININGER, E.; SARA, R.; CETICA, P. Study of sperm evaluation parameters to estimate cryopreserved bovine semen fertility. **Austin Journal of Veterinary Science & Animal Husbandry**, v. 2, n. 1, p. 1–4, 2015.
- MUIÑO, R.; PEÑA, A. I.; RODRÍGUEZ, A.; TAMARGO, C.; HIDALGO, C. O. Effects of cryopreservation on the motile sperm subpopulations in semen from Asturiana de los Valles bulls. **Theriogenology**, v. 72, n. 6, p. 860–868, 2009.
- MUIÑO, R.; TAMARGO, C.; HIDALGO, C. O.; PEÑA, A. I. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: Effects of cryopreservation and between-bull variation. **Animal Reproduction Science**, v. 109, n. 1–4, p. 27–39, 2008.
- NAGY, A.; POLICHRONOPOULOS, T.; GÁSPÁRDY, A.; SOLTÍ, L.; CSEH, S. Correlation between bull fertility and sperm cell velocity parameters generated by computer-assisted semen analysis. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 63, n. 3, p. 370–381, 2015.
- NISOLI, E.; CARRUBA, M. O. Nitric oxide and mitochondrial biogenesis. **Journal of Cell Science**, v. 119, n. 14, p. 2855–2862, 2006.
- NOGUEIRA, É.; DO NASCIMENTO BATISTA, D. S.; DA COSTA FILHO, L. C. C.; DIAS, A. M.; SILVA, J. C. B.; ÍTAVO, L. C. V. Pregnancy rate in lactating *Bos indicus* cows subjected to fixed-time artificial insemination and treated with different follicular growth inducers. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 43, n. 7, p. 358–362, 2014.

NOGUEIRA, É.; SILVA, A. S.; GRANDE, C.; DIAS, A. M.; GRANDE, C.; CARLOS, L.; ITAVO, V.; GRANDE, C.; BATISTOTE, E. **Taxa de prenhez de vacas Nelore submetidas a protocolos de IATF no Pantanal de MS Corumbá**: Embrapa Pantanal.

NOHL, H.; STANIEK, K.; KOZLOV, A. V. The Existence and Significance of a Mitochondrial Nitrite Reductase. Redox Report: **Communications in Free Radical Research**, v. 10, n. 6, p. 281–286, 2005.

OLIVEIRA, B. M.; ARRUDA, R. P.; THOMÉ, H. E.; MATURANA FILHO, M.; OLIVEIRA, G.; GUIMARÃES, C.; NICHI, M.; SILVA, L. A.; CELEGHINI, E. C. C. Fertility and uterine hemodynamic in cows after artificial insemination with semen assessed by fluorescent probes. **Theriogenology**, v. 82, n. 5, p. 767–72, 15 set. 2014.

OLIVEIRA, L. Z. **Utilização de diferentes touros na IATF: características seminais e suas relações com as taxas de fertilidade a campo**. 2012. Universidade de Botucatu.

OLIVEIRA, L. Z.; ARRUDA, R. P. De; ANDRADE, A. F. C. De; CELEGHINI, E. C. C.; REEB, P. D.; MARTINS, J. P. N.; SANTOS, R. M. Dos; BELETTI, M. E.; PERES, R. F. G.; MONTEIRO, F. M.; HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M. Assessment of *in vitro* sperm characteristics and their importance in the prediction of conception rate in a bovine timed-AI program. **Animal Reproduction Science**, v. 137, n. 3–4, p. 145–155, 2013.

OLIVEIRA, L. Z.; DE ARRUDA, R. P.; DE ANDRADE, A. F. C.; CELEGHINI, E. C. C.; DOS SANTOS, R. M.; BELETTI, M. E.; PERES, R. F. G.; OLIVEIRA, C. S.; HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M. Assessment of field fertility and several *in vitro* sperm characteristics following the use of different Angus sires in a timed-AI program with suckled Nelore cows. **Livestock Science**, v. 146, n. 1, p. 38–46, 2012.

OLIVEIRA, L. Z.; MONTEIRO, F. M.; CARLA, E.; CELEGHINI, C. The Importance of Semen Quality in AI Programs and Advances in Laboratory Analyses for Semen Characteristics Assessment. In: Success in Artificial Insemination - Quality of Semen and Diagnostics Employed. **Intech**, p. 1–16, 2013.

OLIVEIRA, L. Z.; OLIVEIRA, C. S.; MONTEIRO, F. M.; LIMA, V. F. M. H. de; LIMA, F. M. de; COSTA, M. Z. Efeito da idade sobre as principais características andrológicas de touros Brangus-Ibagé criados extensivamente no estado do Mato Grosso do Sul - Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 1, p. 1–8, 2011.

ORTEGA-FERRUSOLA, C.; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, L.; MURIEL, A.; MACÍAS-GARCÍA, B.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; TAPIA, J.; ALONSO, J.; PEÑA, F. Does the Microbial Flora in the Ejaculate Affect the Freezeability of Stallion Sperm ?. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, p. 518–522, 2009.

ORTEGA FERRUSOLA, C.; GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, L.; MORRELL, J. M.; SALAZAR SANDOVAL, C.; MACÍAS GARCÍA, B.; RODRÍGUEZ-MARTINEZ, H.; TAPIA, J. a; PEÑA, F. J. Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. **Reproduction**, v. 138, n. 1, p. 55–63, 2009.

OSTERMEIER, G. C.; SARGEANT, G. A.; YANDELL, B. S.; EVENSON, D. P.; PARRISH, J. J. Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 4, p. 595–603, 2001.

- PARK, Y.; KWON, W.; OH, S.; PANG, M. Fertility-related proteomic profile of bull spermatozoa separated by percoll. **Journal of Proteome Research**, v. 11, p. 4162–4168, 2012.
- PEDDINTI, D.; NANDURI, B.; KAYA, A.; FEUGANG, J. M.; BURGESS, S. C.; MEMILI, E. Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. **BMC Systems Biology**, v. 2, p. 19, 2008.
- PEÑA, F. Multiparametric flow cytometry: a relevant tool for sperm function evaluation. **Animal Reproduction**, v. 12, n. 3, p. 351–355, 2015.
- PEÑA, F.; PLAZA DAVILA, M.; BALL, B.; SQUIRES, E.; MARTIN MUÑOZ, P.; ORTEGA FERRUSOLA, C.; BALAO DA SILVA, C. The impact of reproductive technologies on stallion mitochondrial function. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, n. 4, p. 529–537, 2015.
- PIOMBONI, P.; FOCARELLI, R.; STENDARDI, A.; FERRAMOSCA, A.; ZARA, V. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. **International Journal of Andrology**, p. 1–16, 2010.
- PIOMBONI, P.; FOCARELLI, R.; STENDARDI, A.; FERRAMOSCA, A.; ZARA, V. The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. **International Journal of Andrology**, v. 35, n. 2, p. 109–124, 2012.
- PLANCHET, E.; KAISER, W. M. Nitric oxide (NO) detection by DAF fluorescence and chemiluminescence: a comparison using abiotic and biotic NO sources. **Journal of Experimental Botany**, v. 57, p. 3043–3055, 2006.
- PODEROSO, J. J.; CARRERAS, M. C.; LISDERO, C.; RIOBÓ, N.; SCHÖPFER, F., & BOVERIS, A. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 328, n. 1, p. 85–92, 1996.
- RAMALHO-SANTOS, J.; VARUM, S.; AMARAL, S.; MOTA, P. C.; SOUSA, A. P.; AMARAL, A. 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.
- RAPHAEL, C. F. **Efeitos da centrifugação nas características de movimento, integridade e peroxidação lipídica das membranas do espermatozoide equino refrigerado**. 2007.
- ROESSNER, C.; PAASCH, U.; GLANDER, H. J.; & GRUNEWALD, S. Activity of nitric oxide synthase in mature and immature human spermatozoa. **Andrologia**, v. 42, n. 2, p. 132–137, 2010.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: Still Utopia?. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, n. 4, p. 312–318, 2003.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Can we increase the estimative value of semen assessment? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, n. SUPPL. 2, p. 2–10, 2006.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Semen evaluation techniques and their relationship with fertility. **Animal Reproduction**, v. 10, n. 3, p. 148–159, 2013.
- RUBIO-GUILLÉN, J.; GONZÁLES, D.; GARDE, J.; ESTESO, M.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.; RODRÍGUEZ-GIL, J.; MADRID-BURY, N.; QUINTERO-MORENO, A. Effects of cryopreservation on bull spermatozoa distribution in morphometrically distinct subpopulations. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 354–357, 2007.

SAACKE, R. G. Semen quality in relation to semen preservation. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 12, p. 2635–2644, 1983.

SÁ FILHO, M. F.; CRESPILO, a. M.; SANTOS, J. E. P.; PERRY, G. a.; BARUSELLI, P. S. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. **Animal Reproduction Science**, v. 120, n. 1–4, p. 23–30, 2010.

SÁ FILHO, O. G.; MENEGHETTI, M.; PERES, R. F. G.; LAMB, G. C.; VASCONCELOS, J. L. M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: Strategies and factors affecting fertility. **Theriogenology**, v. 72, n. 2, p. 210–218, 2009.

SANTOS, F. B. **Relação da qualidade do sêmen com a fertilidade após IATF em vacas de corte**. 2016a. Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo.

SANTOS, A. P. C. **Identificação de subpopulações espermáticas por características morfométricas e fertilidade em sêmen bovino *Bos taurus indicus***. 2016b. Dissertação de mestrado. Universidade de Lavras.

SCOTT, I.; RAMIREZ-REVECO, A.; PARODI, J. The restraint of bovine sperm cell motility increases survival : role of extracellular calcium in the phenomena the restraint of bovine sperm cell motility increases survival : role of extracellular calcium in the phenomena. **Journal of Veterinary Science & Technology**, v. 7, n. 5, p. 1–6, 2016.

SEIDEL, G. E. Several insights on evaluation of semen. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 329–332, 2012.

SELLEM, E.; BROEKHUIJSE, M. L. W. J.; CHEVRIER, L.; CAMUGLI, S.; SCHMITT, E.; SCHIBLER, L.; KOENEN, E. P. C. Use of combinations of *in vitro* quality assessments to predict fertility of bovine semen. **Theriogenology**, v. In press, p. 1–8, 2015.

SHAHANI, S. K.; S.G., R.; C.G., A.; R.D., M. Mid-piece length of spermatozoa. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 13, n. 16, p. 802–808, 2010.

SILVA, F. M.; MARQUES, A.; CHAVEIRO, A. Reactive Oxygen Species : A Double-Edged Sword in Reproduction. **The Open Veterinary Science Journal**, v. 4, p. 127–133, 2010.

SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M.; COLENBRANDER, B.; ROELEN, B. A. J. Exposure of bovine sperm to pro-oxidants impairs the developmental competence of the embryo after the first cleavage. **Theriogenology**, v. 67, n. 3, p. 609–619, fev. 2007.

SIQUEIRA, J. B.; GUIMARÃES, J. D.; PAULINO, E.; ALEXANDRE, C.; TORRES, A.; VINÍCIUS, M.; BARBOSA, G.; SILVEIRA, S. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática *in vitro*. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 2, p. 387–395, 2007.

SOUSA, A. P.; AMARAL, A.; BAPTISTA, M.; TAVARES, R.; CABALLERO CAMPO, P.; CABALLERO PEREGRÍN, P.; FREITAS, A.; PAIVA, A.; ALMEIDA-SANTOS, T.; RAMALHO-SANTOS, J. Not all sperm are equal: functional mitochondria characterize a subpopulation of human sperm with better fertilization potential. **PloS One**, v. 6, n. 3, p. e18112, 2011.

TARTAGLIONE, C. M.; RITTA, M. N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of *in vitro* fertility of frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 62, n. 7, p. 1245–1252, 2004.

- SUDANO, J. M.; CRESPILO, A. M.; FERNANDES, C. B.; JUNIOR, A. M.; PAPA, F. O.; RODRIGUES, J.; MACHADO, R.; LANDIM-ALVARENGA, F. D. C. Use of bayesian inference to correlate in vitro embryo production and in vivo fertility in zebu bulls. **Veterinary Medicine International**, v. 2011, p. 1–6, 2011.
- TARTAGLIONE, C. M.; RITTA, M. N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 62, n. 7, p. 1245–1252, out. 2004.
- ULBRICH, S. E.; ZITTA, K.; HIENDLEDER, S.; WOLF, E. *In vitro* systems for intercepting early embryo-maternal cross-talk in the bovine oviduct. **Theriogenology**, v. 73, n. 6, p. 802–16, 1 abr. 2010.
- URIBE, P.; BOGUEN, R.; TREULEN, F.; SÁNCHEZ, R.; VILLEGAS, J. V. Peroxynitrite-mediated nitrosative stress decreases motility and mitochondrial membrane potential in human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v. 21, n. 3, p. 237–43, 2015.
- VALOUR, D.; MICHOT, P.; EOZENOU, C.; LEFEBVRE, R.; BONNET, a.; CAPITAN, a.; UZBEKOVA, S.; SELLEM, E.; PONSART, C.; SCHIBLER, L. Dairy cattle reproduction is a tightly regulated genetic process: Highlights on genes, pathways, and biological processes. **Animal Frontiers**, v. 5, n. 1, p. 32–41, 2015.
- VALVERDE, A.; ARENÁN, H.; SANCHO, M.; CONTELL, J.; YÁÑIZ, J.; FERNÁNDEZ, A.; SOLER, C. Morphometry and subpopulation structure of Holstein bull spermatozoa: variations in ejaculates and cryopreservation straws. **Asian Journal of Andrology**, v. 18, p. 851–857, 2016.
- VENKATESH, S.; DEECARAMAN, M.; KUMAR, R.; SHAMSI, M. B.; DADA, R. Role of reactive oxygen species in the pathogenesis of mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in male infertility. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 129, n. 2, p. 127–37, fev. 2009.
- VERA-MUNOZ, O.; AMIRAT-BRIAND, L.; DIAZ, T.; VÁSQUEZ, L.; SCHMIDT, E.; DESHERCES, S.; ANTON, M.; BENCHARIF, D.; TAINURIER, D. Effect of semen dilution to low-sperm number per dose on motility and functionality of cryopreserved bovine spermatozoa using low-density lipoproteins (LDL) extender: Comparison to Triladyl® and Bioxcell®. **Theriogenology**, v. 71, n. 6, p. 895–900, 2009.
- VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149–179, 2002.
- VINCENT, P.; UNDERWOOD, S. L.; DOLBEC, C.; BOUCHARD, N.; KROETSCH, T.; BLONDIN, P. Bovine semen quality control in artificial insemination centers. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 153–165, 2012.
- WATERHOUSE, K. E.; HAUGAN, T.; KOMMISRUUD, E.; TVERDAL, A.; FLATBERG, G.; FARSTAD, W.; EVENSON, D. P.; DE ANGELIS, P. M. Sperm DNA damage is related to field fertility of semen from young Norwegian Red bulls. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, n. 7, p. 781–788, 2006.
- WANG, Jiangtao et al. Effect of exogenous nitric oxide on sperm motility *in vitro*. **Biological Research**, v. 47, n. 1, p. 44, 2014.
- WATSON, P. F. Recent Developments and Concepts in the Cryopreservation of Spermatozoa and the Assessment of their Post-thawing Function. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 7, p. 871–891, 1995.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 481–492, 2000.

YÁNIZ, J. L.; PALACÍN, I.; VICENTE-FIEL, S.; SÁNCHEZ-NADAL, J. A.; SANTOLARIA, P. Sperm population structure in high and low field fertility rams. **Animal Reproduction Science**, v. 156, p. 128–134, 2015.

YÁNIZ, J.; VICENTE-FIEL, S.; SOLER, C.; RECREO, P.; CARRETERO, T.; BONO, A.; BERNÉ, J.; SANTOLARIA, P. Comparison of different statistical approaches to evaluate morphometric sperm subpopulations in man. **Asian Journal of Andrology**, v. 18, p. 819–823, 2016.

ZHANG, B. R.; LARSSON, B.; LUNDEHEIM, N.; HA, M. G. H. Prediction of bull fertility by combined *in vitro* assessments of frozen $\pm$ thawed semen from young dairy bulls entering an AI-programme. **International Journal of Andrology**, v. 260, p. 253–260, 1999.

ZHANG, Hong; ZHENG, Rong-Liang. Possible role of nitric oxide on fertile and asthenozoospermic infertile human sperm functions. **Free Radical Research**, v. 25, n. 4, p. 347–354, 1996.

ZIELONKA, J.; KALYANARAMAN, B. Hydroethidine- and MitoSOX-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: Another inconvenient truth. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, n. 8, p. 983–1001, 2010.

10 APÊNDICES**APÊNDICE A – *SETUP*- SISTEMA CASA PARA SÊMEN BOVINO (Sperm Class Analyzer® - SCA®, Microptic, Barcelona Espanha)**

Característica	Ajuste
Número de imagens adquiridas (Image capture: frames)	25
Imagens capturadas por segundo (Image capture: frames per sec)	25
Optica (Optics)	Ph-
Câmara (Chamber)	Mackler
Escala (Scale)	10X
Tamanho mínimo da célula (Cell detection: minimum size)	15 microns ²
Tamanho máximo da célula (Cell detection: minimum size)	70 microns ²
Referência de STR para células progressivas (Progressive cell: STR)	75%
Referência de VAP para células lentas (Slow cells: VAP Cut-off)	20,0 µm/s
Referência de VAP para células Intermediarias (Medium cells: VAP Cut-off)	25 µm/s
Referência de VAP para células rápidas (Rapid cells: VAP Cut-off)	50 µm/s
Referência de LIN para células circulares (Circular: % LIN)	50
VAP points	5
Temperatura (Stage: Set stage temperature)	37°C
Seleção de campos	Manual

APÊNDICE B – DESCRIÇÃO DAS SONDAS FLUORESCENTES**a. FITC-PNA**

- ✓ Nome do produto: Lectina obtida de *Arachis hypogaea*, conjugada com FITC
- ✓ Referência do Produto: L7381
- ✓ Marca: Sigma 1mg/ mL

b. JC-1

- ✓ Nome do produto: iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetil benzimidazolilcarbocianina
- ✓ Referência do Produto: T3168
- ✓ Peso molecular 204,62
- ✓ Solução trabalho com 153 μ M

c. C11- BODIPY 581/591

- ✓ Referência do Produto: D-3861
- ✓ PM: 504,43 (1 mg)
- ✓ Solução trabalho com 2 mM em 1 mL de DMSO

d. SYTO-59

- ✓ 5mM em 100 μ L de DMSO
- ✓ Concentração na solução final: 5nM
- ✓ Solução estoque: 500 μ M
- ✓ Solução trabalho com 750nM

e. YOPRO -1

- ✓ Referência do Produto: Y3603
- ✓ Solução estoque: 1 mL- 1 mM = 100 μ M
- ✓ Solução trabalho (DMSO) – 7,5 μ M
- ✓ 1,5 μ L de DMSO

f. DIHIDROETIDIUM (DHE)

- ✓ 25 mg = 0,025 g
- ✓ PM= 315,417 g/mol

- ✓ Solução estoque: $x \text{ uL} , 10\text{mM} = 1000 \text{ uL} , 0,3 \text{ mM}$
- ✓ Solução trabalho: $x = 360 \text{ uM} (0,36 \text{ mM})$
- ✓ Solução final de $2,4 \text{ uM}$:

g. DIHIDRORODAMINA (DHR)

- ✓ Nome do produto: DIHIDRORODAMINA 123
- ✓ Referência do Produto: D1054
- ✓ Marca: Sigma-Aldrich
- ✓ Formula: $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$
- ✓ Peso molecular: $346,38 \text{ g/mol}$
- ✓ Frasco 2 mg

h. MITOSOX™ Red

- ✓ Nome do produto: MitoSOX™ Red
- ✓ Referência do Produto: (M36008)
- ✓ Marca: Sigma-Molecular probes™

APÊNDICE C – PROTOCOLOS COMPENSAÇÃO DAS SONDAS

a. Compensação das membranas plasmática e acrossomal por citometria de fluxo

Controle	Concentração	Volume	Tempo	Leitura	Indução
PNA positivo	37,5 µg/mL	1 µL	10 min	FL1-A	FF
PI positivo	0,5 mg/mL	1 µL	10 min	FL3-A	FF
SYTO negativo	750Mm	2 µL	10 min	FL4-A	TALP
Controle negativo TRIPLA	Idem	Idem	Idem	Idem	TALP
Controle positivo TRIPLA	Idem	Idem	Idem	Idem	FF
Branco	-	-	-	-	Sem sonda

Legenda: FF: Flash-frozen: (5 ciclos de imersão no nitrogênio líquido e no banho Maria 56°C),

Fonte: Molecular probes, 2017

b. Compensação do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo

Controle	Sonda	Concentração	Volume	Tempo	Leitura	Indução
JC-1 j-agregados	JC-1	153 µM	1 µL	10 min	FL2-A	TALP
JC-1 monomeros (verde)	JC-1	153 µM	1 µL	10 min	FL1-A	FF
PI positivo	PI	0,5 mg/mL	1 µL	10 min	FL3-A	FF
SYTO negativo	SYTO	750 mM	2 µL	10 min	FL4	TALP
Controle negativo TRIPLA	Idem	Idem	Idem	Idem	Idem	TALP
Controle positivo TRIPLA	Idem	Idem	Idem	Idem	Idem	FF
Branco	-	-	-	-	-	Sem sonda

FF= Flash frozen (5 ciclos de imersão no nitrogênio líquido e no banho Maria 56°C),

Fonte: Molecular probes, 2017

c. Compensação da Produção de ânion superóxido pela mitocôndria espermática

Controle	Sonda	Concentração	Volume	Tempo	Leitura	Indução
MSR negativo	MSR	1 mg/mL	1 µL	30 min		TALP
MSR positivo	MSR	1 mg/mL	1 µL	30 min	FL2	DPI + ANT
YOPRO positivo	YOPRO	0,5 mg/mL	1 µL	20 min	FL1	FF
SYTO negativo	SYTO	750 Mm	1,5 µL	10 min	FL4	TALP
TRIPLA Controle negativo	Idem	Idem	Idem	Idem	Idem	TALP
TRIPLA Controle positivo	Idem	Idem	Idem	Idem	Idem	DPI + ANT
Branco	-	-	-	-	-	Sem sonda

Legenda: DPI: Diphenyleneiodonium chloride, ANT: Antimicina, FF: Flash-frozen, uma hora antes da incubação,

Fonte: Molecular probes, 2017

d. Compensação de ânion superóxido citoplasmático Dihidroetidium (DHE)

Controle	Sonda	Concentração	Volume	Tempo	Leitura	Indução
DHE negativo	DHE	360 µM	1 µL	30 min	FL2-A	TALP
DHE positivo	DHE	360 µM	1 µL	30 min	FL2-A	Coctel*
YOPRO positivo	YOPRO	0,5 mg/mL	1 µL	20 min	FL1-A	FF
SYTO negativo	SYTO	750 mM	2 µL	10 min	FL4-A	TALP
TRIPLA	Idem	Idem	Idem	Idem	Idem	TALP
TRIPLA	Idem	Idem	Idem	Idem	Idem	Coctel*
Branco	-	-	-	-	-	Sem sonda

* Coctel: 100µL de sulfato de ferro 4mM + 100µL de ácido ascórbico 20mM + 200µL de peróxido de hidrogênio 4mM, durante 30 minutos, pre incubação,

Pointer Location: 755nm, 117%

Fonte: Molecular probes, 2017

e. Compensação de Peroxidação lipídica

Controle	Sonda	Concentração	Volume	Tempo	Leitura	Indução
BODIPY -	BODIPY	1 mg/mL	1 µL	30 min	FL1-A	TALP
BODIPY +	BODIPY	1 mg/mL	1 µL	30 min	FL1-A	Coctel*
SYTO -	SYTO	750 mM	2 µL	10 min	FL4-A	TALP
PI +	PI	0,5 mg/mL	1 µL	10 min	FL3-A	FF
TRIPLA	Idem	Idem	Idem	Idem	Idem	TALP
TRIPLA	Idem	Idem	Idem	Idem	Idem	Coctel
Branco	-	-	-	-	-	Sem sonda

* Coctel: 100µL de sulfato de ferro 4mM + 100µL de ácido ascórbico 20mM + 200µL de peróxido de hidrogênio 4mM, durante 30 minutos, pre incubação,

Fonte: Molecular probes, 2017

f. Compensação da espécies reativas de nitrogênio no espermatozoide

Controle	Sonda	Concentração	Volume	Tempo	Leitura	Indução
D-Rhodo -	D-Rhodo	50 μ m	3 μ L	30 min	FL1-A	TALP
D-Rhodo+	D-Rhodo	50 μ m	3 μ L	30 min	FL1-A	L-arginina (10 mM)
PI +	PI	0,5 mg/mL	1 μ L	10 min	FL3-A	FF
SYTO -	SYTO	750 mM	2 μ L	10 min	FL4-A	TALP
TRIPLA -	Idem	Idem	Idem	Idem	Idem	TALP
TRIPLA +	Idem	Idem	Idem	Idem	Idem	L-arginina (10 mM)
Branco	-	-	-	-	-	Sem sonda

Legenda: FF: Flash-frozen, L-arginina (10 mM) uma hora de indução,

Fonte: Molecular probes, 2017

g. Compensação da espécies reativas de nitrogênio no espermatozoide

Controle	Sonda	Concentração	Volume	Tempo	Leitura	Indução
DAF -	DAF	10 μ m	1 μ L	30 min	FL1-A	TALP
DAF +	DAF	10 μ m	1 μ L	30 min	FL1-A	L-arginina (10 mM)
PI +	PI	0,5 mg/mL	1 μ L	10 min	FL3-A	FF
SYTO -	SYTO	750 mM	1,5 μ L	10 min	FL4-A	TALP
TRIPLA -	Idem	Idem	Idem	Idem	Idem	TALP
TRIPLA +	Idem	Idem	Idem	Idem	Idem	L-arginina (10 mM)
Branco	-	-	-	-	-	Sem sonda

Legenda: FF: Flash-frozen, L-arginina (10 mM) uma hora de indução,

Fonte: Molecular probes, 2017

APÊNDICE D – INDUTORES PARA COMPENSAÇÃO**1. ANTIMICYN A (ANT)**

- ✓ Nome do produto: ANTIMICINA - A obtida de STREPTOMYCES SP,
- ✓ Referência do Produto: A8674 25mg
- ✓ Marca: Sigma Formula: C₂₈H₄₀N₂O₉
- ✓ Peso molecular: 548,63 g/mol

a. Solução estoque 10mM

Adicionar 4,6 mL de DMSO em 25 mg de Antinicyn A

b. Solução de trabalho 1 mM

Usar 100 µL da solução estoque e diluir em 900 µL DMSO

c. Incubação amostra em 20 µM

Em 980 µL de sêmen adicionar 20 µL da solução de trabalho de Antimycina (1 mM)

2. DIPHENYLENEIODONIUM CHLORIDE (DPI)

- ✓ Nome do produto: D2926
- ✓ Molecular Formula: C₁₂H₈ICl
- ✓ Peso molecular: 314,6
- ✓ Sinônimos: DPI, Dibenziodolium chloride

a. Solução Estoque 10 mM:

Diluir o frasco 10 mg com 3,17 mL de DMSO

b. Solução de Trabalho 1mM

Usar 100 µL da solução estoque e diluir em 900 µL DMSO

c. Incubação amostra em 10 µM

Em 990 µL de sêmen adicionar 10 µL da solução de trabalho de DPI (1 mM)

Incubação 1 hora

3. INDUÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO COM L-ARGININA

- Solução de trabalho de L-arginina= 10 mM
- PM= 174,2g (Preparo de 1 mL de água Mili Q)

4. INDUÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO

Uma alíquota de 400 µL de sêmen foi incubada durante 30 minutos, a temperatura de 37°C, com as seguintes soluções:

- 100µL de sulfato de ferro 4mM
- 100µL de ácido ascórbico 20mM
- 200µL de peróxido de hidrogênio 4mM

APÊNDICE E – CORRELAÇÕES DAS VARIÁVEIS DO IMAGEM-J

Pearson Correlation Coefficients, N = 2481												
Prob > r under H0: Rho=0												
	AREA	XP	YP	XM	YM	PERIM	BY	WIDT H	HEIGH T	MAJO R	MINO R	CIRC
AREA	1	0,01606	-	0,01927	-	-	-	0,18091	0,18475	0,71931	0,83321	-
			0,01405		0,01503	0,18227	0,18475					0,01602
		0,424	0,4842	0,3373	0,4542	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	0,4251
XP	0,01606	1	0,00704	0,98405	0,01095	-	0,01186	0,01884	-0,00889	-	0,04457	0,02232
						0,00411				0,02315		
	0,424		0,7259	<,0001	0,5857	0,838	0,5549	0,3483	0,6579	0,249	0,0264	0,2663
YP	-	0,00704	1	0,00584	0,93982	0,02434	-	-	0,03033	0,0204	-	-
	0,01405						0,01162	0,02092			0,03709	0,01108
	0,4842	0,7259		0,7713	<,0001	0,2255	0,563	0,2977	0,1309	0,3097	0,0647	0,5813
XM	0,01927	0,98405	0,00584	1	-	0,00219	0,00423	0,01115	-0,00097	-	0,04985	0,02508
					0,00649					0,02409		
	0,3373	<,0001	0,7713		0,7466	0,9133	0,8331	0,5789	0,9614	0,2304	0,013	0,2117
YM	-	0,01095	0,93982	-	1	0,01237	-	-	0,01748	0,02146	-	-
	0,01503			0,00649			0,00118	0,00925			0,04017	0,00139
	0,4542	0,5857	<,0001	0,7466		0,5379	0,9532	0,6453	0,384	0,2854	0,0454	0,9447
PERIM	-	-	0,02434	0,00219	0,01237	1	-0,841	-	0,84438	-	-	0,08776
	0,18227	0,00411						0,99807		0,16293	0,12586	
	<,0001	0,838	0,2255	0,9133	0,5379		<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
BY	-	0,01186	-	0,00423	-	-0,841	1	0,84318	-0,99744	-	-	0,03417
	0,18475		0,01162		0,00118					0,21203	0,09433	
	<,0001	0,5549	0,563	0,8331	0,9532	<,0001		<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	0,0888
WIDTH	0,18091	0,01884	-	0,01115	-	-	0,84318	1	-0,8463	0,16164	0,12515	-
			0,02092		0,00925	0,99807						0,08943
	<,0001	0,3483	0,2977	0,5789	0,6453	<,0001	<,0001		<,0001	<,0001	<,0001	<,0001
HEIGHT	0,18475	-	0,03033	-	0,01748	0,84438	-	-0,8463	1	0,2101	0,096	-
		0,00889		0,00097			0,99744					0,03769
	<,0001	0,6579	0,1309	0,9614	0,384	<,0001	<,0001	<,0001		<,0001	<,0001	0,0605
MAJOR	0,71931	-	0,0204	-	0,02146	-	-	0,16164	0,2101	1	0,22084	-
		0,02315		0,02409		0,16293	0,21203					0,11995
	<,0001	0,249	0,3097	0,2304	0,2854	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001		<,0001	<,0001
MINOR	0,83321	0,04457	-	0,04985	-	-	-	0,12515	0,096	0,22084	1	0,07169
			0,03709		0,04017	0,12586	0,09433					
	<,0001	0,0264	0,0647	0,013	0,0454	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001	<,0001		0,0004
CIRC	-	0,02232	-	0,02508	-	0,08776	0,03417	-	-0,03769	-	0,07169	1
	0,01602		0,01108		0,00139			0,08943		0,11995		
	0,4251	0,2663	0,5813	0,2117	0,9447	<,0001	0,0888	<,0001	0,0605	<,0001	0,0004	